

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Vliv nutričních mastných kyselin na progresi adrenoleukodystrofie

Bakalářská práce

2021

Veronika Görögová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Görögová**
Osobní číslo: **C18162**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Vliv nutričních mastných kyselin na progresi adrenoleukodystrofie**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními údaji o vzniku a průběhu onemocnění adrenoleukodystrofií se zaměřením na poruchy metabolismu nutričních lineárních mastných kyselin C20 – C26.
2. Popište vhodné a nevhodné potraviny pro nemocné adrenoleukodystrofií na základě obsahu lineárních mastných kyselin C20 – C26.
3. Popište současné diagnostické metody pro stanovení typu adrenoleukodystrofie včetně údajů o možnostech jejich léčby.
4. Podrobně popište metodiku klinicko-biochemické diagnostiky adrenoleukodystrofie pomocí chromatografie na tenké vrstvě a plynové chromatografie.
5. Shromážděte a tabelujte referenční intervaly koncentrací dlouhých mastných kyselin v krvi, nebo v lipoproteinových frakcích využívané k diagnóze adrenoleukodystrofie.
6. Popište současnou léčbu této nemoci a nové experimentální postupy a léčiva.
7. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o diagnostických a léčebných postupech u nemocných adrenoleukodystrofií.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Rattay T.W., Rautenberg M., Söhn A.S., et al.: Defining diagnostic cutoffs in neurological patients for serum very long chain fatty acids (VLCFA) in genetically confirmed X-Adrenoleukodystrophy. *Scientific Report*, 2020, vol. 10, p. 15093. Další literární zdroje podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Martina Špryncová**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Vliv nutričních mastných kyselin na progresi adrenoleukodystrofie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na mojí práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 13.7.2021

Veronika Görögová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala především svému vedoucímu bakalářské práce panu prof. Ing. Alexandru Čeganovi, CSc., za odborné vedení, nasměrování, vstřícný přístup a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za velkou podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá adrenoleukodystrofií, při nichž probíhá porucha peroxizomální β -oxidace a dochází k akumulaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem ve tkáních a tělních tekutinách. Práce se zabývá vlivem nutričních mastných kyselin na její progresi. V úvodní části je práce zaměřená na mastné a esenciální kyseliny. Dále se zabývá historií, genetikou, patogenezí a klinickými projevy adrenoleukodystrofie. V dalších částech jsou uvedeny možnosti diagnostiky adrenoleukodystrofie, a především možnosti její léčby. Poslední část je zaměřená na popisu metodiky plynové chromatografie a tenkovrstvé chromatografie.

KLÍČOVÁ SLOVA

adrenoleukodystrofie, mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, esenciální mastné kyseliny, nutriční mastné kyseliny, β -oxidace, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie

TITLE

Influence of nutritional fatty acids on adrenoleukodystrophy progress

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with adrenoleukodystrophy, in which peroxisomal β -oxidation is disrupted and very long-chain fatty acids accumulate in tissues and body fluids. The bachelor thesis deals with the influence of nutritional fatty acids on its progression. In the introductory part, the work is focused on fatty and essential acids. It also deals with the history, genetics, pathogenesis and clinical manifestations of adrenoleukodystrophy. The following sections present the possibilities of diagnosing adrenoleukodystrophy, and especially the possibilities of its treatment. The last part is focused on the description of the methodology of gas chromatography and thin layer chromatography.

KEYWORDS

adrenoleukodystrophy, very long chain fatty acids, essential fatty acids, nutritional fatty acid, β -oxidation, gas chromatography, thin layer chromatography

OBSAH

1. ÚVOD	12
2. MASTNÉ KYSELINY	13
2.1. Dělení mastných kyselin	13
2.2. Fyzikálně a chemické vlastnosti mastných kyselin.....	14
2.3. Biosyntéza a β -oxidace mastných kyselin.....	14
2.4. Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem	16
2.4.1. β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem	16
2.5. Esenciální mastné kyseliny	17
3. ADRENOLEUKODYSTROFIE	19
3.1. Historie adrenoleukodystrofie	20
3.2. Výskyt adrenoleukodystrofie	22
3.3. Klinické formy	22
3.3.1. Cerebrální forma ALD	23
3.3.2. Adolescentní cerebrální forma.....	23
3.3.3. Addisonova choroba	23
3.3.4. Asymptomatická forma.....	24
3.3.5. Adrenomyeloneuropatie.....	24
3.4. Genetika	25
3.5. Patogeneze.....	26
3.6. Diagnostika	28
3.6.1. Zobrazovací technika	29
3.6.2. Molekulárně-genetická diagnostika	30
3.6.3. Prenatální diagnostika a novorozenecký screening	31
3.6.4. Biochemická diagnostika.....	32
3.7. Výskyt a původ VLCFA	34

3.7.1.	Referenční rozmezí koncentrací VLCFA	35
3.8.	Terapie.....	37
3.8.1.	Lorenzův olej	38
3.8.2.	Imunosupresivní léčba	39
3.8.3.	Transplantace kostní dřeně	39
3.8.4.	Genová terapie	40
3.8.5.	Pioglitazon a leriglitazon	41
3.8.6.	Hormonální substituční léčba	41
3.8.7.	Lovastatin.....	41
3.9.	Dietní terapie	42
4.	CHROMATOGRRAFIE	44
4.1.	Derivatizace.....	45
4.2.	Tenkvrstvá chromatografie	45
4.3.	Plynová chromatografie (GC).....	47
4.3.1.	Nosný plyn.....	47
4.3.2.	Regulační systém	48
4.3.3.	Dávkovací zařízení	48
4.3.4.	Termostat	49
4.3.5.	Kolony	49
4.3.6.	Detektory	50
4.3.7.	Chromatogram	50
5.	ZÁVĚR	52
6.	POUŽITÁ LITERATURA	53
7.	CITACE OBRÁZKŮ A TABULEK	64

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Seznam obrázků:

Obrázek 1. - β -oxidace mastných kyselin až na acetyl-CoA	15
Obrázek 2. - β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v peroxizomech a mitochondriích	17
Obrázek 3. - Biosyntéza a metabolismus vysoce nenasycených mastných kyselin	19
Obrázek 4. - Nahromaděné VLCFA v buňce u pacientů s ALD.	20
Obrázek 5. - Snímek magnetické rezonance se stabilní lézí ve splenu u pacienta s X-ALD ...	30
Obrázek 5. – Tenkovrstvá chromatografie	47
Obrázek 7. - Schéma plynového chromatografu	48
Obrázek 8. - Záznam chromatogramu	51

Seznam tabulek:

Tabulka 1. – Referenční rozmezí hodnot VLCFA u pacientů s X-ALD	36
Tabulka 2. - Hladiny VLCFA a plazmatického cholesterolu u pacientů s X-ALD.....	37
Tabulka 3. – Obsah mastných kyselin v olejích a tucích v % z celkových mastných kyselin .	43
Tabulka 4. – Obsah C26:0 v běžných potravinách mg na 100 g.	44

SEZNAM ZRATEK A ZNAČEK

AA: kyselina arachidová

ACP: acyly přenášející protein

ACTH: adrenokortikotropní hormon

ALD: adrenoleukodystrofie

ALDP: adrenoleukodystrofický protein

ALDPR: ALD související protein

AMN: adrenomyeloneuropatie

ATP: adenosintrifosfát

CCALD: cerebrální forma ALD

CNS: centrální nervová soustava

CT: počítačová tomografie

DHA: kyselina dokosahexaenová

DNA: nukleová kyselina

EDTA: ethylendiamintetraoctová kyselina

EFA: esenciální mastné kyseliny

ELOVL1: elongáza 1 mastných kyselin

FA: mastné kyseliny

FAME: methylestery mastných kyselin

FID: plamenově ionizační detektor

GC: plynová chromatografie

GC-MS: plynová chromatografie
s hmotnostní spektrometrií

GTO: mononasyčená kyselina olejová

GTE: mononasyčená kyselina eruková

HPLC: vysokoúčinná kapalinová
chromatografie

LA: kyselina linolová

LCFA: mastné kyseliny s dlouhým
řetězcem

LC-MS/MS: kapalinová chromatografie
s tandemovou hmotností spektrometrií

LC-PUFA: polynenasycené mastné
kyseliny s dlouhým řetězcem

LDL: lipoproteiny o nízké hustotě

MCFA: mastné kyseliny se středně
dlouhým řetězcem

MK: mastné kyseliny

MR: magnetická rezonance

MS/MS: tandemová hmotnostní
spektrometrie

MUFA: mononenasyčené mastné kyseliny

PCR: polymerázová řetězová reakce

PUFA: polynenasycené masné kyseliny

SCFA: mastné kyseliny s krátkým
řetězcem

SD: směrodatná odchylka

TPC: tenkovrstvá chromatografie

UPLC: ultra výkonný kapalinový
chromatograf

VLCFA: mastné kyseliny s velmi
dlouhým řetězcem

VPA: kyselina valproová

X-ALD: X-vázaná adrenoleukodystrofie

1. ÚVOD

Adrenoleukodystrofie (ALD) je nejběžnější z peroxizomálních poruch a je biochemicky charakterizovaná akumulací mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA) ve tkáních a biologických tekutinách. Nejběžnější forma adrenoleukodystrofie je X-vázaná adrenoleukodystrofie (X-ALD), přičemž mutace je v genu ABCD1, který se mapuje na Xq28 a kóduje protein peroxizomální membrány. X-ALD je dědičné metabolické onemocnění s incidencí 1:16 800, onemocnění se manifestuje častěji u mužů, ale mírnější formy se vyskytují i u žen. U adrenoleukodystrofie dochází k odchýlení metabolismu lipidů, především dochází k β -oxidaci VLCFA v peroxizomech. Peroxizomy degradují mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem a deficitní transport aktivovaného VLCFA. Nastává akumulace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v nadledvinách, bílé hmotě nervového systému, plazmě a dalších tkáních. U pacientů tedy dochází k adrenální nedostatečnosti, neurodegeneraci a k zánětlivé demyelinizaci.

Diagnostika adrenoleukodystrofie je založena především na měření hladin VLCFA v plazmě, pomocí plynové chromatografie, kdy se převážně stanovují zvýšení plazmatické hladiny kyseliny cerotové (C26:0) a zároveň i její zvýšení v poměru C26:0/C22:0. Provádějí se rozsáhlé testy, pomocí biochemických, imunologických a molekulárně genetických analýz. ALD se diagnostikuje také pomocí počítačové tomografie (CT), magnetické rezonance (MR) a provádí se prenatální a novorozenecký screening. Prostřednictvím prenatální diagnostiky je umožněno ženě s ALD zjištění, zdali plod nese mutaci ABCD1 genu. V případě novorozeneckého screeningu dochází k úspěchu v časně diagnostice ALD, a tedy i jeho následné terapii.

U onemocnění adrenoleukodystrofie není doposud žádná kauzální léčba, jsou aplikovány pouze terapeutické možnosti. Je tedy především zahájena dietní terapie a mezi další možnosti patří farmakoterapeutická, imunosupresivní léčba, genová terapie, transplantace kostní dřeně a hematopoetických kmenových buněk. Dříve byl pro terapii nejvíce používán Lorenzův olej, který je složen ze směsi mononenasycené kyseliny olejové a mononenasycené kyseliny erukové v poměru 4:1, tato terapie je považována za zastaralou a také za málo spolehlivou. K léčbě jsou využívány i přípravky k léčbě diabetu jako je pioglitazon a leriglitazon, které snižují oxidační stres, obnovují mitochondriální funkci, zlepšují přežit

neuronů a mají další příznivé účinky při léčbě ALD. V současné době probíhá spousta studií, které by vedly ke zlepšení terapie u ALD, ale nejvyšší prioritou zůstává prevence.

2. MASTNÉ KYSELINY

Mastné kyseliny (FA) jsou součástí lipidů, respektive tuků. Tuky společně se sacharidy a bílkovinami, patří mezi tři základní živiny, které jsou nezbytnými složky lidské výživy. Jako zdroj energie pro organismus a řady esenciálních látek jsou považovány lipidy. Jsou také nositelem důležitých látek, jako například vitamínů rozpustných v tucích, sterolů a dalších. Mají funkce strukturální. Vyskytují se jako prekurzory důležitých signálních molekul, například prostaglandinů, leukotrienů. Jejich příjem je důležité pro správný vývoj centrálního nervového systému. Mastné kyseliny se nejčastěji vyskytují jako estery v přírodních tucích a olejích, ale mohou se nacházet i jako volné mastné kyseliny, tudíž jsou v neesterifikované podobě. [1, 2, 3]

2.1. Dělení mastných kyselin

Mastné kyseliny, které se nacházejí v přírodních tucích jsou většinou syntetizovány z dvou uhlíkových jednotek, proto nevětvený řetězec obsahuje sudý počet uhlíkových atomů. Mastné kyseliny mohou být nasycené nebo nenasycené karboxylové kyseliny s uhlíkovým řetězcem dlouhým 2 až 36 atomů. Nasycené mastné kyseliny neobsahují žádné dvojné vazby. Jako základ nasycených mastných kyselin je považována kyselina octová, od které se ostatní kyseliny odvozují zařazením $-CH_2-$ skupiny mezi koncový methyl $-CH_3$, a karboxyl $-COOH$. Mezi tyto nasycené mastné kyseliny patří například kyselina palmitová, stearová, arachová a další. Nenasycené mastné kyseliny, které obsahují jednu nebo více dvojných vazeb, se dále dělí monoenoové, polyenoové, eikosanoidy. Mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) obsahují pouze jednu dvojnou vazbu a patří mezi ně například kyselina palmitolejová, olejová, eruková. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), které obsahují dvě nebo více dvojných vazeb, se dále ještě dělí na omega-3 PUFA a omega-6 PUFA, a to podle umístění poslední dvojných vazeb. Příkladem nenasycených mastných kyselin je kyselina arachidonová, dále kyselina linolová, která patří mezi omega-6, přičemž mezi omega-3 patří α -linolenová kyselina. [3, 4]

Dále se FA dělí dle délky řetězce. Jsou rozděleny na krátké mastné kyseliny (SCFA), mastné kyseliny se středním řetězcem (MCFA), mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA) a mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA). Méně, než šest atomů uhlíků tvoří krátké mastné kyseliny, mezi které řadíme kyselinu octovou (C2), kyselinu propionovou (C3) a

kyselinu máselnou (C4). Mastné kyseliny se středním řetězcem mají 8-12 uhlíků a patří zde například kyselina laurová (C12), kyselina kaprinová (C10) a kyselina kaprylová (C8). Mastné kyseliny, které mají 14-18 uhlíků jsou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, kde řadíme kyselinu stearovou (C18), kyselinu palmitovou (C16) a kyselinu myristovou (C14). Více jak dvacet atomů uhlíků tvoří mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem a mezi ně patří kyselina arachová (C20), kyselina behenová (C22), kyselina lignocerová (C24) a další. [1, 2]

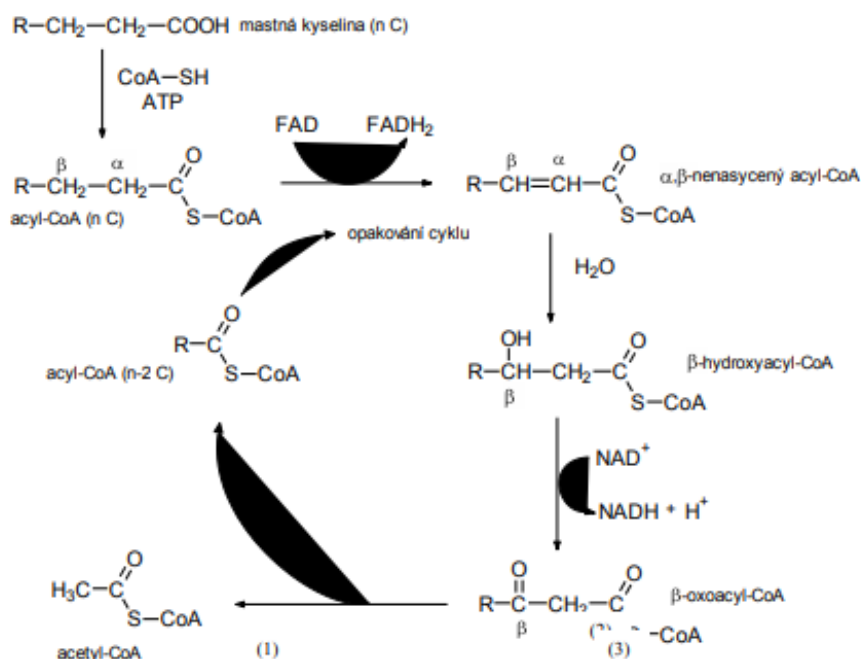
2.2. Fyzikálně a chemické vlastnosti mastných kyselin

Vlastnosti FA z fyziologického a fyzikálního pohledu jsou především ovlivněny délkou řetězce a také stupněm nenasycenosti. S délkou řetězce se zvyšují body tání mastných kyselin se sudým počtem uhlíků, přičemž s počtem dvojných vazeb se body tání snižují. Nenasycené mastné kyseliny, které se vyskytují v přírodě, jsou v konfiguraci *cis* a jejich molekuly jsou ohnuté o 120° v místě dvojných vazeb. K rozmanitému prostorovému uspořádání molekuly vede zvýšení počtu dvojných vazeb. Snižování van der Waalsových interakcí a teploty způsobuje *cis*-konfigurace, protože dochází k zaujmutí většího prostoru. Mikroviskozitu a tloušťku buněčné membrány také ovlivňuje stupeň nenasycenosti. Rozpuštěnost mastných kyselin ve vodě klesá s prodlužujícím se řetězcem. Micely se začínají tvořit, jestliže mastné kyseliny mají koncentraci nad tzv. kritickou micelární koncentrací. Karboxylové skupiny v micelách směřují do vodné fáze, přičemž hydrofobní části jsou orientovány ke středu. Liposomy jsou tvořeny ve fosfolipidech z esterifikovaných mastných kyselin. [2, 4, 5]

2.3. Biosyntéza a β -oxidace mastných kyselin

Oxidační odbourávání mastných kyselin až na acetyl-CoA je označováno jako β -oxidace. Jedná se o opakující se série reakcí, u kterých dochází ke zkracování řetězce o dva atomy uhlíku. β -oxidace probíhá v mitochondriích podstatě všech buněk, kromě buněk v mozku, a to z toho důvodu, že mastné kyseliny nemohou procházet pře hematoencefalitickou bariéru. Před zahájením oxidace musí být mastné kyseliny aktivovány, k aktivaci dochází esterifikací s CoA. Ve vazbě na látku karnitin probíhá transport mastných kyselin do mitochondrií. Odbourávání probíhá na spirále, tzv. Lynenově spirále, přičemž probíhají čtyři na sebe navazující reakce. Probíhá dehydrogenace acyl-CoA na 2-enoyl-CoA, přičemž vzniká FADH₂, následuje adice vody za vzniku 3-hydroxyacyl-CoA, poté probíhá dehydrogenace za vzniku β -ketoacyl-CoA. Poté dochází k thiolýze, kdy se tvoří acetyl-CoA. Molekuly acetyl-CoA, které jsou odštěpeny, následně vstupují do citrátového cyklu. V citrátovém cyklu se získá

12 ATP, a to oxidací jedné molekuly acetyl-CoA. β -oxidace je významným zdrojem ATP, při níž vzniká 129 ATP. [6, 7, 8, 9]



Obrázek 1. - β -oxidace mastných kyselin až na acetyl-CoA. Převzato z [1]

Mastné kyseliny jsou nejen přijímány potravou, ale mohou být i syntetizovány v organismu. Acetyl-CoA je výchozí látkou pro syntézu a vzniká převážně v mitochondriích. Membrány mitochondrií nejsou pro acetyl-CoA propustné, jejich přenos do cytosolu je uskutečňován pomocí karnitinu, případně přeměnou na citrát. Hlavním produktem syntézy je kyselina palmitová, která je postupně syntetizována po dvou uhlících, které jsou poskytnuty malonyl-CoA, což je energeticky bohatší produkt karboxylace acetyl-CoA. ACP jsou meziproducty biosyntézy. Malonyl-CoA, který je napojený na ACP podstoupí čtyři na sebe navazující reakce. Probíhá tedy kondenzace, první redukce, dehydratace a druhá redukce. Syntéza začíná kovalentním připojením substrátů na dvě sulfhydrylové skupiny. Na jednu se váže malonyl-, na druhou se váže acetyl, přičemž jsou uvolněny molekuly CoA. Poté začíná kondenzace acetylu na malonylový radikál a zároveň probíhá dekarboxylace. Poté následuje první redukce keto-skupiny acetoacetylu. Pro vytvoření methylenové skupiny následuje dehydratace, kdy se řetězec přenáší na sulfhydrylovou skupinu cysteinu. Skupina fosfopantotheinu je volná, a tudíž je schopná vázat další molekulu malonyl-CoA. Pro dosažení řetězce s šestnácti uhlíky je nutné tento proces šestkrát opakovat. Poté je odpojována volná mastná kyselina a část palmitátu se přemění na jiné mastné kyseliny desaturací či elongací. Některé

esenciální mastné kyseliny musí člověk získat z potravy, protože není možná jejich desaturace, tyto kyseliny jsou například kyselina linolenová a linolová. [2, 7, 10]

2.4. Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem

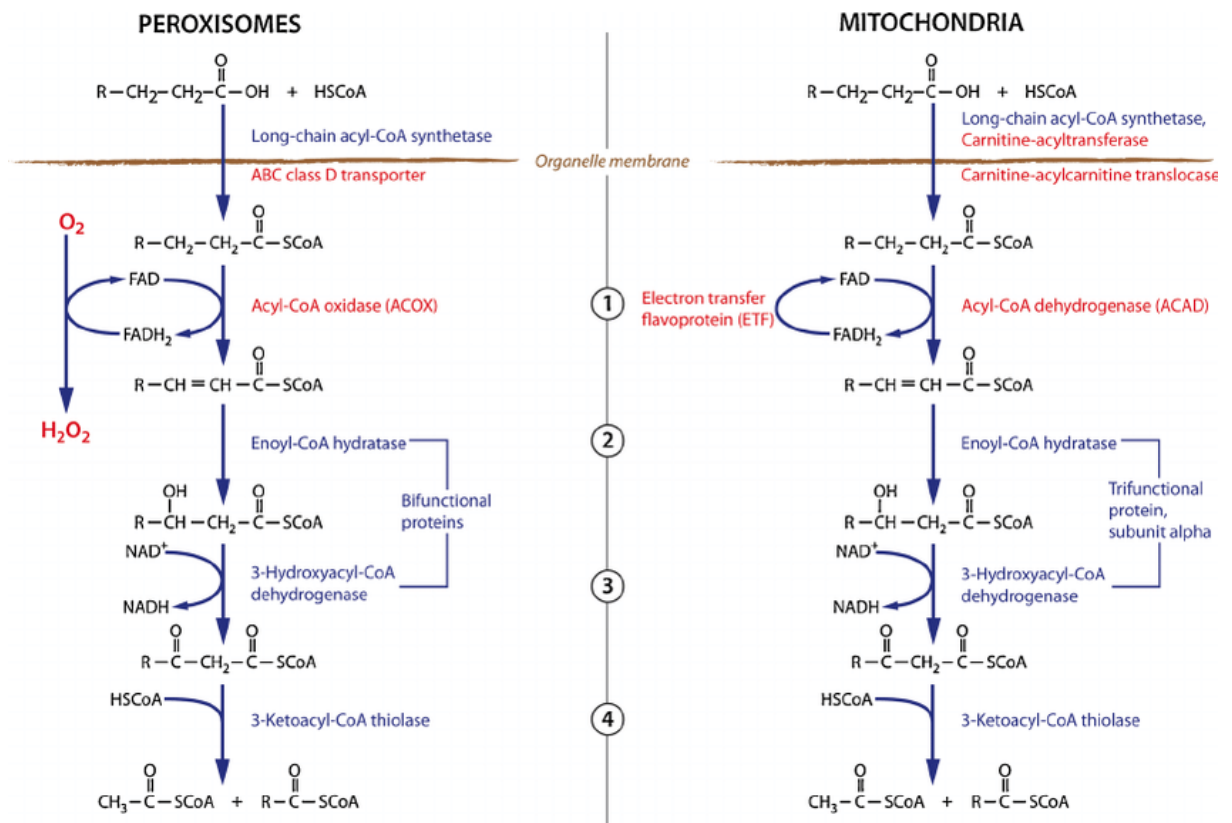
Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem jsou tvořeny z více jak dvaceti atomů uhlíku. Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem jsou v anglickém překladu very long chain fatty acid, tudíž jsou nazývány VLCFA. Mezi mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem patří například kyselina arachová (20:0), behenová (22:0), lignocerová (24:0), cerotová (26:0) a další. [2]

2.4.1. β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem

β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem začíná v peroxizomech, kde nastává proces zkracování řetězce mastných kyselin. Při β -oxidaci, ale nedochází ke zisku energie, jak je tomu při β -oxidaci v mitochondriích. Z důvodů pórů v membráně peroxizomů, není potřeba transportních bílkovin pro vstup molekul. Avšak v případě výskytu více typů karnitinacyl-CoA aminotransferázy v membráně je transport umožněn acylkarnitinem do peroxizomů. Acetyl-CoA aktivuje širokou škálu mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a tento enzym je obsažen v membráně peroxizomů. Dále se na aktivaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem podílí adrenoleukodystrofický protein (ALDP). [11, 12]

Při β -oxidaci VLCFA probíhá sled čtyř na sebe navazujících reakcí, které odpovídají sledu reakcí v mitochondriích, vyjma první reakce. V peroxizomen při první dehydrogenaci dochází k přenosu redukčních ekvivalentů na kyslík, přičemž vzniká peroxid vodíku. Peroxid vodíku je využit pro spřažené oxidační reakce, ale z důvodů jeho vysoké reaktivnosti je pro buňku problémový, a proto je všechno jeho nadbytečné množství ihned degradováno přítomnou katalázou, za vzniku vody a kyslíku. Následující kroky β -oxidace VLCFA jsou stejné jako sled reakcí probíhající v mitochondriích, pouze jsou uplatněny jiné enzymy, ale se stejným účinkem. Peroxizomy mají dvě různé acyl-CoA oxidázy, kdy jeden z enzymů katalyzuje oxidaci CoA esterů 2-methyl-karboxylových kyselin a druhý zajišťuje oxidaci monokarboxylových kyselin se středně dlouhým řetězcem a s velmi dlouhým řetězcem. D-bifunkční protein (DBP) katalyzuje v peroxizomech druhou i třetí reakci β -oxidace. Prostřednictvím dvou peroxizomálních thiolázám je zprostředkována poslední ze čtyř na sebe navazujících dějů. Při metabolismu 2-methyl-karboxylových kyselin, hraje podstatnou úlohu peroxizomová thioláza-2, přičemž u metabolismu mastných kyselin s nerozvětveným řetězcem je uplatněna i thioláza-

1 společně s thiolázou-2. β -oxidace VLCFA je ukončena u mastných kyselin s délkou řetězce o čtyřech až šesti atomech uhlíku a tyto FA jsou prostřednictvím karnitinu přeneseny do mitochondrií, kde dochází ke konečnému rozkladu na acetyl-CoA. [11, 12, 13, 14]



Obrázek 2. - β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v peroxizomech a mitochondriích. Převzato z [2]

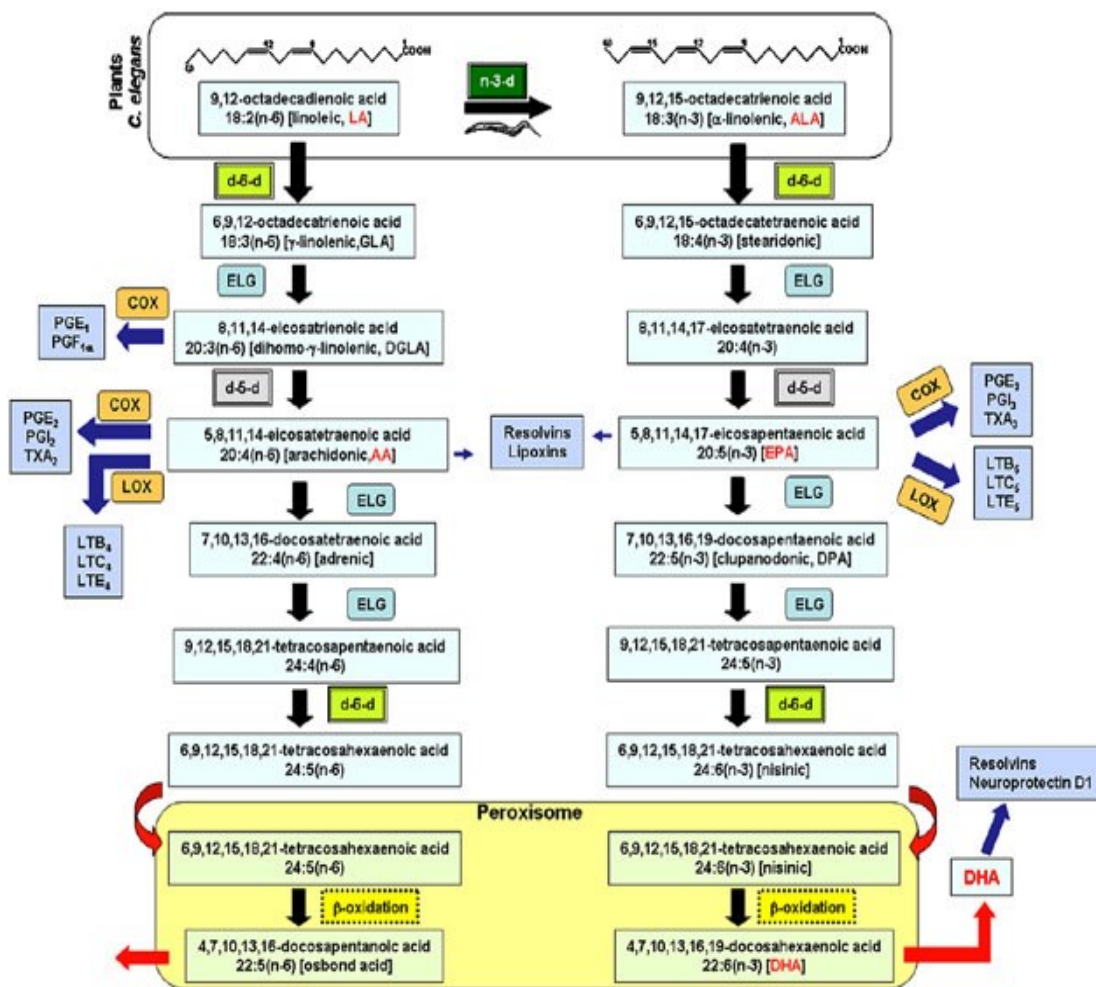
2.5. Esenciální mastné kyseliny

Esenciální mastné kyseliny obsahují 2 a více dvojných vazeb a jsou to vysoce nasycené mastné kyseliny. Jelikož si člověk není schopen syntetizovat omega-3 a omega-6 vysoce nenasycené mastné kyseliny, tak musí být kyselina linolová (LA) a kyselina α -linolenová (ALA) obsažené v potravě. Jsou důležitou složkou všech membrán a také jsou obsaženy v permeabilní bariéře pokožky. Eikosanoidy hrají důležitou regulační úlohu ve tkáních a jsou tvořeny jako prekursory z esenciálních mastných kyselin. Některé z EFA metabolitů s dlouhým řetězcem tvoří prekursory příslušných prostaglandinů (PG), tromboxanů (TX) a leukotrienů (LT), ale také vedou k lipoxinům (LX) a rezolvinům, které mají silné protizánětlivé účinky. Metabolity LA a ALA s delšími řetězci jsou zvláště důležité při regulaci funkce membrány a

mají i zásadní význam pro mozek, sítnici, játra, ledviny, nadledviny a pohlavní žlázy. [28, 39, 76]

Mezi omega-3 MK patří kyselina dokosahexanová, α -linolenová a eikosapentaenová, jejím zdrojem je především řasový či rybí olej. Mezi omega-6 MK patří například kyselina linolová, která je obsažena v rostlinném oleji a transformuje se v těle na arachidonovou kyselinu. Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, konkrétně kyselina arachidonová (AA) a kyselina dokosahexaenová (DHA), se během vývoje rychle hromadí v šedé hmotě mozku, dostupnost mastných kyselin v potravě ovlivňuje složení FA v mozku.

Lipidy tvoří 50-60% suché hmotnosti mozku dospělého jedince, z čehož přibližně 35 % je ve formě LPCPUFA, zejména kyselina arachidonová a jsou odvozeny biosyntézou z jejich příslušných prekurzorů EFA, tedy kyseliny linolové a α -linolenové. Získávají se přímo z dietních zdrojů, jako jsou vejce, ryby, maso a z jednobuněčných olejů. Kyselina arachidonová se nachází v relativně vysokých hladinách v mnoha tkáních, zatímco kyselina dokosahexaenová se vyskytuje ve vysokých hladinách pouze v několika tkáních mimo centrální nervový systém, jako jsou varlata, ale také je podíl lipidů v sítnici a šedé hmotě mozku. [15, 28, 39, 75]



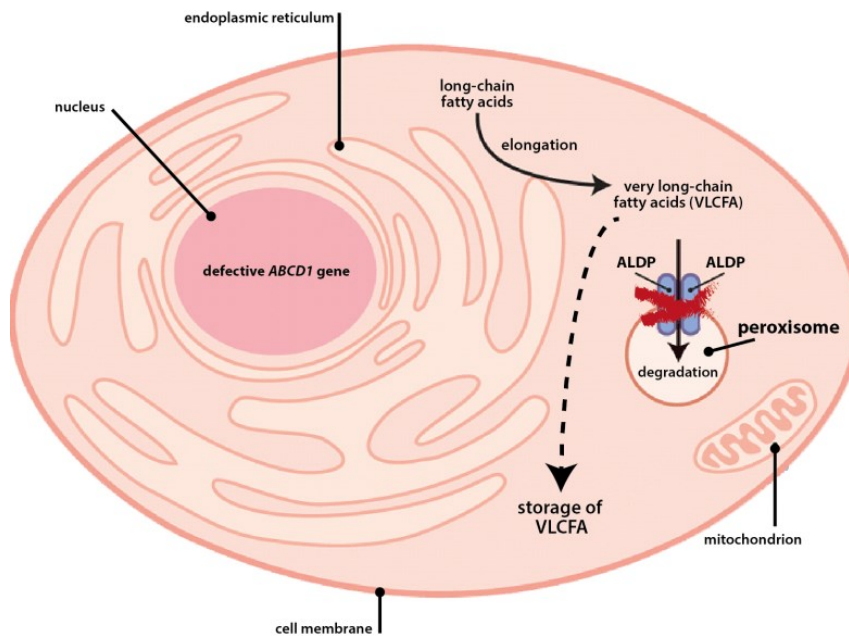
Obrázek 3. - Biosyntéza a metabolismus vysoce nenasycených mastných kyselin. Převzato z [10]

Omega-3 mastné kyseliny jsou potřebné pro vývoj a dělení mozkových buněk. V případě, že je nedostatek omega-3 MK v nervové soustavě, může docházet ke vzniku abnormalit a poškození buněk i organel. Nedostatek tedy vede k neurosenzorickým defektům a komplikacím v chování. EFA mají vliv na transport živin, stavbu membrány a buněčné interakce. Dostatečná konzumace těchto mastných kyselin předchází výskytu kardiovaskulárních chorob. Pro duševní zdraví je správná rovnováha mezi omega-3 a omega-6 mastnými kyselinami v membránách mozkových buněk. DHA a AA hrají nejdůležitější funkci v nervové soustavě, proto je nutné do své stravy doplňovat dostatek omega-3 a omega-6 mastných kyselin. [28, 74, 75]

3. ADRENOLEUKODYSTROFIE

X-vázaná adrenoleukodystrofie (X-ALD) je nejběžnější peroxizomální porucha, která je charakterizována adrenální insuficiencí a neurologickou manifestací. Tento typ dědičnosti je

gonozomálně recesivní, jelikož je gen ABCD1 lokalizován na Xq28 proto především toto onemocnění projevuje u mužského pohlaví. Je způsobená mutacemi v X-chromozomálním ABCD1 genu. Mutace ABCD1 genu ovlivňuje funkci proteinu ALDP a je jeho nedostatek ovlivňuje peroxizomální β -oxidaci VLCFA. Zhoršená peroxizomální β -oxidace vede k akumulaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v krvi a různých tkáních, například v míše, kůře nadledvin a dalších. Mezi VLCFA patří například kyselina cerotová, lignocerová. Zvýšená koncentrace těchto látek způsobuje demyelinizaci centrálního nervového systému a adrenální kortikální nedostatečnost. X-vázaná adrenoleukodystrofie se dále také označuje jako Schilderova choroba, adrenomyeloneuropatie, sudanofilní leukodystrofie nebo také X-linked ALD. [16,17,18,23]



Obrázek 4. - Nahromaděné VLCFA v buňce u pacientů s ALD. Převzato z [3]

3.1. Historie adrenoleukodystrofie

První případ X-vázané adrenoleukodystrofie byl pravděpodobně popsán na konci 19. století. Heubner v roce 1897 popsal případ mladého chlapce s rychle progresivním neurologickým zhoršením shodným s X-ALD, tento případ byl následně při pitvě klasifikován jako „difuzní skleróza“. Označení „difuzní skleróza“ se v té době používalo pro jakékoliv případy onemocnění bílé hmoty způsobující ztvrdnutí tkáně. Podobný případ difuzní sklerózy, který se podobal X-ALD, popsal také v roce 1899 Ceni a také Haberfield a Spieler v roce 1910. Krátce poté Schilder navrhl, aby označení difuzní skleróza byla přesnější a klasifikoval toto onemocnění jako leukodystrofii. Schilder dále popsal několik případů s lézemi na mozkové bílé

hmotě a s perivaskulárním zánětem, které označil jako encefalitida periaxialis diffusa. Následně se syndrom rychle progresivní mozkové demyelinizace se zánětlivými změnami bílé hmoty při provedení pitvy stal známým jako „Schilderova choroba“. V roce 1910 Haberfeld a Spieler popsali případ šestiletého chlapce, u kterého se vyvinuly poruchy v pohybu očí i vidění a byl apatický. O čtyři měsíce později se jeho chůze začala zhoršovat a postupovala k neschopnosti chodit. V sedmi letech byl hospitalizován, měl spasmickou paraparézu, nemluvil, trpěl inkontinencí a také se u něj střídala těžká apatie s podrážděností. Byla zaznamenána i tmavá kůže, o které nijak nebylo řečeno. Chlapec zemřel po 8 měsících hospitalizace a jeho starší bratr zemřel ve věku 8,5 let se stejnými příznaky. Paul Schilder následně provedl pitvu mozku a tento případ označil jako „encefalitidu periaxialis diffusa“, která je charakteristická difúzním postižením mozku se ztrátou myelinu, které připomínalo roztroušenu sklerózu. V tomto případě nebyly hlášeny žádné nálezy v ledvinách. V následujících padesáti letech bylo popsáno mnoho podobných případů, ale i přesto je popsání prvního případu X-ALD připisováno Siemerlingovi a Creutzfeldtovi, protože jako první popsali souvislost akutní mozkové demyelinizace s klinickými a patologickými příznaky Addisonovy choroby. [14, 19, 20, 21]

Po padesáti letech od počátečního popisu choroby prokázali Powers a Schaumburg neobvyklé pruhování v adrenokortikálních buňkách, které bylo prokázáno elektronovým mikroskopem. Na základě přítomnosti lipidových inkluzí v nadledvinách, varlatech, mozku a Schwannových buňkách spekulovali, že by mohlo jít o poruchu ukládání lipidů. Později se ukázalo, že tyto inkluze obsahovaly estery cholesterolu s vysokým množstvím mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem. Po potvrzení těchto nálezů, byla označena X-vázaná adrenoleukodystrofie jako choroba lipidů. Singh u pacientů s X-ALD prokázal sníženou schopnost degradace VLCFA a potvrdil, že tato reakce probíhá v peroxizomech. Po tomto zjištění bylo X-ALD uznáno do kategorie peroxizomálních poruch spolu se Zellwegerovým syndromem. Poté Singh určil oxidační defekt mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a jejich narušené schopnosti tvořit koenzym-A deriváty, což vedlo k domněnce, že základní defekt zahrnoval enzym mastná kyselina s velmi dlouhým řetězcem koenzym-A syntetáza (VLCS). [19, 20]

V Baltimoru a v Japonsku v letech 1978 a 1981 bylo dokázáno, že X-ALD může být spolehlivě diagnostikována prokázáním abnormálně vysokých úrovní VLCFA v kultivovaných kožních fibroblastech, v plazmě a v červených krvinkách. Metabolické studie prokázaly, že VLCFA jsou metabolizovány především v peroxizomech a tato oxidace VLCFA je snížena ve

fibroblastech od pacientů s adrenoleukodystrofií. Biochemické a ultrastrukturální techniky vedly k poznání mírnějších fenotypů X-ALD u dospělých, jako je adrenomyeloneuropatie. V roce 1980 bylo představeno, že nahromadění VLCFA v mozku pacienta s X-ALD jsou alespoň z části dietního původu a bylo pozorováno, že mononenasyčené mastné kyseliny, jako jsou například kyselina olejová a eruková, snižují jejich endogenní syntézu. V roce 1981 byl gen X-ALD lokalizován do terminálního segmentu dlouhého raménka X-chromozomu na Xq28. Poté v roce 1993 Mosser a kolegové izolovali gen pozičním klonováním a zjistili, že gen kóduje protein peroxizomální membrány, označovaný jako ALDP, který váže ATP. V roce 2001 bylo prokázáno, že adrenoleukodystrofie je nejběžnější peroxizomální poruchou s odhadovaným výskytem 1:17000. Tým vedený Dr. Moserovou v roce 2006 představil vysoce výkonnou metodu analýzy VLCFA, která umožnila velké pokroky ve screeningu VLCFA a umožnila zjištění adrenoleukodystrofie v screeningových programech pro novorozence. [19, 20, 21]

3.2. Výskyt adrenoleukodystrofie

X-vázaná adrenoleukodystrofie především postihuje muže a mírnější formy onemocnění se vyskytují i u žen. X-ALD se vyskytuje zhruba u 1 z 17 000 novorozenců (mužů i žen) a proto je považována za nejčastější peroxizomální poruchu. V USA se předpokládá, že adrenoleukodystrofií je postižen 1 z 21 000 mužů, zatímco je za nositele adrenoleukodystrofie považována 1 z 16 800 žen. X-ALD se vyskytuje ve všech oblastech světa. V české a slovenské republice se ročně prokáže 1 až 2 pacienti s X-vázanou adrenoleukodystrofií. Zhruba až 50 % pacientů mohou být dospělí muži s manifestací adrenomyeloneuropatií a tato skupina pacientů chybí mezi potvrzenými pacienty s X-ALD. Onemocnění má neobvyklou prevalenci 0,5 až 3,3 u 100 000 mužů. V současné době se stal screening novorozenců technicky proveditelným a je zaveden v některých částech světa, tudíž může být skutečná prevalence i vyšší. [19, 22, 23]

3.3. Klinické formy

Podle klinických projevů je diagnostikováno několik fenotypových projevů adrenoleukodystrofie, přičemž není žádný přímý vztah mezi typem mutace a fenotypem. Různé fenotypy onemocnění se mohou dokonce projevit i v rodině se stejnou mutací. X-ALD bylo rozděleno do fenotypů na základě věku pacienta kdy nemoc propukla, oblasti největšího klinického postihnutí a podle progresu neurologických projevů. Moser podle tohoto rozdělení uvádí 7 fenotypů u mužů a 5 fenotypů u žen. [23, 24]

3.3.1. Cerebrální forma ALD

Cerebrální forma ALD má nejzávažnější klinické projevy. Jedná se o nejrychleji progresivní a devastující fenotypy X-ALD. Nejčastěji se vyskytuje u dětí starších 3 let, je označena jako dětská mozková ALD tedy CCALD. A představuje zhruba 30 až 40 % případů adrenoleukodystrofie. Po projevení se onemocnění dochází k progresivnímu deficitu behaviorálních, kognitivních a neurologických funkcí. U pacienta se začíná projevovat špatná orientace v prostoru, emoční labilita, hyperaktivní chování, apraxie, snížená zraková ostrost, sluchové postižení, hemiparéza nebo spasmická tetraparéza, cerebrální ataxie a záchvaty. Tato fáze je extrémně rychlá a devastující. Postižení jedinci mohou během několika týdnů přestat chodit a ztratit schopnost porozumět jazyku. Pacienti jsou nakonec upoutáni na lůžko, jsou slepí, neschopní mluvit či reagovat. Smrt obvykle nastává dva až čtyři roky po projevení příznaků, ale v některých případech, kdy je o pacienta dobře pečováno, může zůstat v zdánlivě vegetativním stavu i několik let. Bylo prokázáno že rychlý neurologický pokles CCALD je způsoben závažným zánětlivým procesem demyelinizace primárně ovlivňující mozkové hemisféry. U posmrtného vyšetření mozkové tkáně, byla odhalena rozsáhlá demyelinizace s perivaskulární infiltrací lymfocytů a makrofágů. [19, 23, 24]

3.3.2. Adolescentní cerebrální forma

Adolescentní cerebrální forma adrenoleukodystrofie se projevuje přibližně ve věku 11 až 21 let a postihuje přibližně 5 % pacientů s ALD. Symptomy onemocnění jsou podobné jako u CCALD, avšak progresse onemocnění je mírnější. U pacientů se pomalu rozvíjí insuficience kůry nadledvin, spasmická paraparéza a také polyneuropatie s akrální převahou. [23, 24]

3.3.3. Addisonova choroba

X-ALD je častou příčinou Addisonovy choroby u pacientů, zejména když jim chybí cirkulující adrenokortikální autoproti látky. Adrenokortikální nedostatečnost bývá v některých případech přítomným příznakem X-ALD, a to několik let či dokonce desetiletí před nástupem prvních neurologických příznaků. U těchto pacientů je vysoké riziko možného rozvoje adrenomyeloneuropatie, které se ale snižuje s přibývajícím se věkem. Adrenokortikální nedostatečnost nejprve ovlivňuje glukokortikoidní funkci nadledvin, ale v konečném důsledku je přibližně u poloviny pacientů s X-ALD nedostatečná mineralokortikoidní funkce. Uznání, že by Addisonova choroba byla způsobena X-ALD, by mělo vážné důsledky na genetické

poradenství, a z toho důvodů je velmi důležité zvážit X-ALD u pacienta s Addisonovou chorobou. [19, 22, 25]

3.3.4. Asymptomatická forma

Asymptomatická forma se projevuje u některých pacientů s genetickou vadou, kteří mají přítomnost vysoce zvýšených hladin mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem, ale navzdory tomu nemají adrenální nedostatečnost a neurologické postižení. U těchto asymptomatických pacientů je ale stále vysoké riziko možného rozvoje adrenální nedostatečnosti či neurologických příznaků. V současné době se těchto asymptomatických pacientů nachází velmi málo. [23, 25]

3.3.5. Adrenomyeloneuropatie

Adrenomyeloneuropatie se prakticky vyskytuje u všech pacientů s X-ALD. Obvyklé příznaky onemocnění se objevují ve věku 30 až 40letých. První příznaky jsou v oblasti míchy a periferních nervů. Postupně se vyvíjí spastická paraparéza, dysfunkce svěrače, senzorická ataxie se sníženým vnímáním vibrací, slabostí nohou a impotence. Zátěž postižení periferních nervů je obvykle mírná a kvůli výrazným příznakům v oblasti míchy je obtížné ji vyhodnotit. U dvou třetin pacientů se vyskytuje i nedostatečnost nadledvin. Přibližně u poloviny pacientů se vyvíjí i mozkové změny a poté se průběh nemoci podobá průběhu jiných mozkových forem ALD. AMN byla dříve často nesprávně diagnostikovaná jako roztroušená skleróza nebo dědičná spasmická paraparéza. Mozková MRI je normální nebo může vykazovat jemné abnormality, ale tyto abnormality nejsou považovány za projevy ALD. Za projev cerebrální ALD se považuje, když zvýšený signál pyramidových traktů stává intenzivnějším a vnitřní kapsle přesahuje do bílé hmoty centra samiovale. MRI míchy zobrazí nespecifickou atrofii, ale nejsou pozorovány žádné demyelinizace nebo zvýšení gadolinia, jako tomu je u roztroušené sklerózy. Během posledních let retrospektivní studie odhalila, že se přibližně u 20 % pacientů s AMN vyvinula další mozková demyelinizace. U pacientů s AMN, u kterých se rozvine cerebrální ALD, jsou pozorovány stejné neurologické příznaky jako u dospělých s cerebrální ALD. Adrenokortikální nedostatečnost má přibližně 70 % pacientů s AMN. Pacienti s adrenomyeloneuropatií často trpí plešatěním již v raném věku, jejich vlasy jsou často tenké a řídké. [19, 23, 25]

Předpokládalo se, že klinické projevy u žen přenášející X-ALD jsou bez příznaků, stejně jako je tomu tak u mnoha nemocí na X-vázaných onemocnění. Klinické projevy se

projevují u žen v pozdějším věku okolo 40 až 50 let. U méně jako 50 % žen přenášejících X-ALD se zjistily neurologické abnormality. U 20 % heterozygotních žen se vyskytují klinické projevy podobné adrenomyeloneuropatie, jako jsou například senzorická ataxie, fekální inkontinence a slabost nohou. Zhruba u 1 až 2 % žen se projevilo postižení CNS a kůry nadledvin. [17, 19, 23]

3.4. Genetika

X-vázaná adrenoleukodystrofie je recesivně dědičná porucha vázaná na chromozom X, a proto se onemocnění projevuje primárně u mužů. Mírnější formy X-ALD se mohou projevit i u heterozygotních žen. X-vázaná adrenoleukodystrofie je gonozomálně recesivní typ dědičnosti. Pokud je žena nositelkou X-ALD genu má u svého každého narozeného dítěte tyto následující možnosti. Pokud je dítětem dcera je 50 % pravděpodobnost, že dcera bude postižena X-ALD genem a 50 % šance, že dcera bude zdravá. V případě, že je dítětem syn je v 50% pravděpodobné, že syn bude postižen adrenoleukodystrofií a v 50% pravděpodobné že nebude ovlivněn. U muže postiženého onemocněním X-ALD, budou všichni jeho synové bez této nemoci, protože otec předává Y chromozom svým synům, avšak všechny jeho dcery budou postiženy X-ALD genem. [19, 23, 26, 27]

V roce 1993 byl identifikovaný ABCD1 gen pomocí techniky pozičního klonování. Gen se nachází na chromozómu X v oblasti Xq28, tedy v blízkosti genového komplexu, který je pro vizuální pigmenty a genu pro glukóza-6-fofát dehydrogenázu. ABCD1 gen se skládá z 10 exonů, jež jsou transkribované ve formě 4,3 kb mRNA, tedy jeden gen zabírá přibližně 19,9 kb genového DNA. X-ALD gen kóduje peroxizomální transmembránový protein (ALDP) obsahující 745 aminokyselin. ALDP spadá do skupiny ABC proteinů, které plní úlohu transportních bílkovin a váží ATP. Protein adrenoleukodystrofie patří do skupiny D, člen 1 (ABCD1). Kromě ALDP byly identifikovatelné další tři transportéry, které mají podobnou nukleotidovou a proteinovou sekvenci a také funkci. V membráně peroxizomů, mohou tyto transportéry tvořit heterodimerové kombinace a zajišťovat transport různým metabolitům. ALPD zajišťuje transport VLCFA přes membránu peroxizomů, a to buď ve formě CoA esterů nebo volných kyselin. [23, 26]

Podrobné informace týkající se počtu a charakteru získaných mutací jsou uvedeny v databázi ALD mutací, a to na webové stránce www.x-ald.nl. V databázi je momentálně uvedeno 894 případů mutací způsobujících X-ALD. Jako nejčastější mutace je považována

mutace měnící smysl (missense mutations), jež způsobuje záměnu nukleotidu způsobující výměnu aminokyselin, v databázi je uvedeno 399 těchto případů mutací, což odpovídá 62 % z celkových mutací X-ALD. Další častá mutace je nesmyslné mutace (nonsense mutations), kdy záměna nukleotidu vede ke vzniku stop kodónu, který tvoří zhruba 10 % ze všech ABCD1 mutací. Mezi další mutace patří posunové mutace, které tvoří 23 % ze všech ABCD1 mutací, 4 % tvoří mutace způsobené inzercí a delecí tří nukleotidů, které způsobují úbytek nebo přírůstek aminokyselin v ALDP. Až v 75 % případů mutací dochází k tomu, že protein není v buňkách degradovaný dostupnými metodami. Nejsou pozorovány žádné významné rozdíly ve frekvenci mutací ve vztahu k jednotlivým exonům, ale i tak dochází k vyššímu zastoupení mutací vykazující úseky genu, které kódují transmembránové domény a ATP vázající doménu. [23, 27]

3.5. Patogeneze

Patogeneze X-ALD a její různé neurologické symptomy nejsou doposud kompletní. Principem dvou různých klinických obrazů onemocnění je zápalové postižení bílé hmoty a nezápalové axonální poškození periferních nervů a míchy. Je pravděpodobné, že axonální postižení, které pozorujeme u adrenomyeloneuropatie je ve skutečnosti primární poškození při ALD, ale 50 % pacientů zemře na zápalové postižení mozku ještě před manifestací axonopatií. Modelové studie na myších potvrzují tuto hypotézu. V této době je největší pozornost věnována roli abnormálně vysoké hladiny VLCFA, hlavní biochemické abnormalitě, která byla dosud prokázána. Je možné že ALDP má další funkce, které nesouvisí s degradací VLCFA. [17, 20]

X-vázaná adrenoleukodystrofie je způsobena mutacemi v genu ABCD1. ABCD1 kóduje ALDP, peroxizomální transmembránový protein podílející se na přenosu CoA esterů VLCFA (C24:0, C26:0) z cytosolu do peroxizomu. Nedostatek ALDP vede k narušení β -oxidace VLCFA v peroxizomech a k nahromadění esterů VLCFA-CoA v buňkách a tkáních. Estery acyl-CoA VLCFA jsou v cytosolu začleněny do různorodých lipidových frakcí, jsou také substrátem pro další prodloužení a vznikají ještě delší FA. EVOVL1 je jednoduchá elognáza katalyzující syntézu nasyceného VLCFA (C26:0) i mononenasyceného VLCFA (C26:1). U X-ALD fibroblastů není exprese EVOVL1 zvýšena, ale zvýšená syntéza VLCFA je způsobena zvýšenou dostupností substrátu. [14, 19, 23]

Byly provedeny různé experimenty in vitro, které prokázaly, že akumulace VLCFA je toxická. Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem jsou extrémně hydrofobní a jejich rychlost

desorpce z biologických membrán je asi 10 000krát nižší než u mastných kyselin s dlouhým řetězcem, proto dochází k rušivým účinkům na strukturu, stabilitu a funkci buněčných membrán. Nadbytek VLCFA v kultivovaných buňkách snižuje uvolňování ACTH-stimulovaného kortizolu lidskými adrenokortikálními buňkami a způsobuje smrt buněk v astrocytech a oligodendrocytech. U in vivo způsobují VLCFA oxidační stres, oxidační poškození proteinů, mikrogliální aktivace a apoptózy. VLCFA indukovaný oxidační stres může přispívat k axonálnímu poškození míchy. Akumulace VLCFA zhoršuje schopnost oligodendrocytů a Schwannových buněk udržovat axonální integritu, což vede k axonálnímu poškození. Nejvíce se z VLCFA hromadí v organismu kyselina lignocerová a kyselina cerotová. Při X-ALD je největší vzrůst VLCFA ve frakcích cholesterol-esterů v mozku a kůry nadledvin. Jako fyziologická hodnota této frakce je obsah VLCFA do 5 %, při X-ALD tento podíl stoupá na 20 až 60 %. Nahromadění cholesterol-esterů s velkým obsahem VLCFA v demyelinizovaných ložiskách se považuje za důsledek, a ne jako příčina demyelinizace. Pravděpodobně tedy za zpuštění zápalového procesu a demyelinizace je zapříčiněná změna struktury gangliosidů, které při vysokém zastoupení VLCFA ztrácejí imunosupresivní funkci. Pravděpodobně jsou i za zpuštění demyelinizace zodpovědné fosfatidylcholinu plazmatických membrán s vysokým obsahem VLCFA v komplexech s bílkoviny. [17, 19, 20, 23]

V mnoha studiích bylo prokázáno, že volné radikály jsou zapojeny do velkého počtu nemocí a jednou z nich by mohlo být X-ALD. Stále více důkazů ukazuje, že poškození způsobené volnými radikály je důležitým faktorem v neurogenerativních, chronicky zánětlivých, vaskulárních a neoplastických onemocněních. Vysoký obsah vysoce peroxidovatelných polynenasycených mastných kyselin v mozkových membránách, zvýšená spotřeba kyslíku a relativně špatná exprese enzymatických antioxidačních obran v nervovém systému podporují vysokou náchylnost těchto orgánů k oxidačnímu poškození. V mozku pacientů s X-ALD byly nalezeny imunohistochemické důkazy o oxidačním stresu a poškození, které vyplývá hlavně z peroxidace lipidů a většinou se vyskytují v zánětlivých demyelinativních lézích ALD nebo AMN a také v kůře nadledvin. Z dosavadních analýz tedy vyplývá, že oxidační stres by mohl být charakteristickým znakem nemoci, aniž by byla poskytnuta informace o časové posloupnosti událostí. Byla provedena studie u myši míchy prokázat oxidační stres dříve než, dochází k neuropatologické degeneraci a klinickému poškození. Byly detekovány identické typy oxidačních lézí in vitro u patientských fibroblastů, což vede k návrhu, že oxidační modifikace proteinů je hlavním faktorem přispívajícím k patogenezi onemocnění. Přebytek VLCFA spouští oxidační stres in vitro a in vivo

v organotypovém systému kultivace řezů míchy. In vivo a in vitro experimenty ukazují, že kyselina valproová (VPA) indukuje ABCD2 genová exprese ve fibroblastech pacientů s X-ALD a snižuje oxidační poškození proteinů. Antioxidační účinky na periferní mononukleární patientské buňky naznačují, že VPA může představovat slibný nový terapeutický přísun pro X-ALD, zejména pro pacienty trpící adrenomyeloneuropatií. [29, 30, 31]

Dysfunkce nadledvin u X-ALD je způsobená primární adrenokortikální nedostatečností a počátečním projevem je zvýšení plazmatického adrenokortikotropního hormonu. ALDP je přítomen pouze v kůře nadledvin, tudíž není přítomen v dřeni nadledvin, zatímco ABCD2 vykazuje opačnou distribuci. To prokazuje patologické nálezy lamel a lamelárních lipidových profilů, u nichž je prokázáno, že obsahují VLCFA esterifikované na cholesterol v adrenokortikálních buňkách. K nahromadění může přispívat několik faktorů, a to například zhoršená kapacita na oxidující VLCFA, to vede ke zvýšenému podílu VLCFA mezi prekurzory cholesterolu mastných kyselin a estery. Podle určitých studií bylo navrženo, že nasycené mastné kyseliny jsou toxické pro adrenokortex, což vede k apoptické buněčné smrti. [20, 32, 33]

3.6. Diagnostika

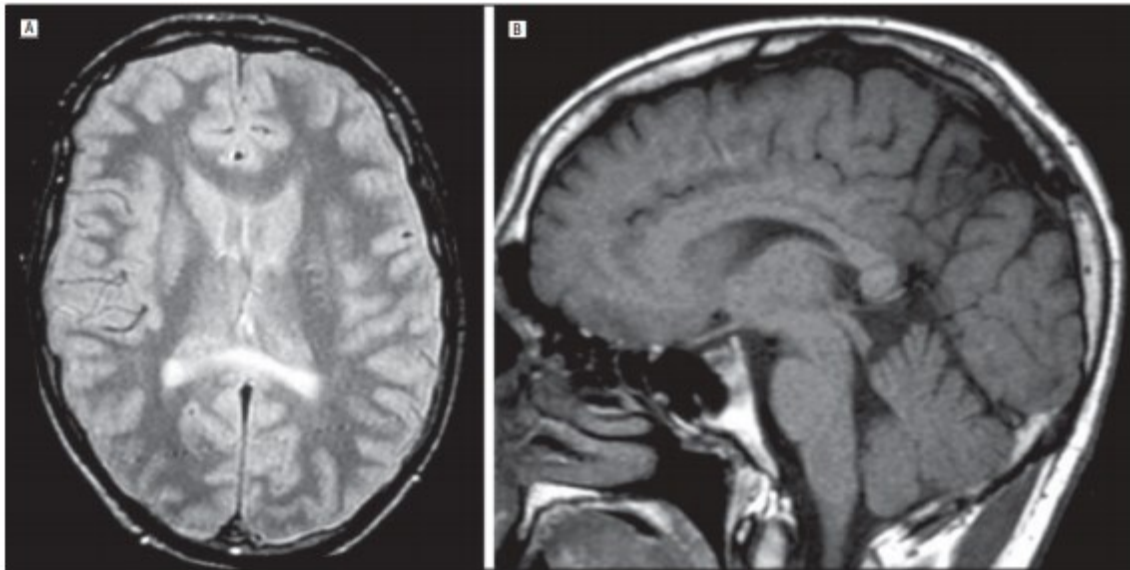
Diagnóza adrenoleukodystrofie by se měla zvažovat ve čtyřech odlišných klinických podmínkách. Jako první u chlapců s příznaky poruchy pozornosti, kteří také vykazují známky demence, ztrátu zraku, zhoršený rukopis, progresivní poruchy chování, potíže s porozuměním mluvené řeči, zhoršení koordinace nebo mají jiné neurologické poruchy. Do další kategorie by měli spadat muži mladého nebo středního věku s progresivními poruchami chůze, ztuhlostí nebo slabostí nohou, se sexuální dysfunkcí a abnormalitami kontroly svěrače, s adrenální nedostatečností nebo bez ní, také muži s kognitivní nebo behaviorálními deficitem. Jako třetí by měli být všichni muži s primární nedostatečností nadledvin, s nebo bez důkazů neurologické abnormality. Jako poslední by měla být diagnóza zvažována u žen středního nebo staršího věku s progresivní paraparérou, abnormalitami kontroly svěrače a smyslovými poruchami postihující hlavně nohy. V některých případech bývá obtížné stanovit diagnózu adrenoleukodystrofie u ženy s negativní rodinnou anamnézou. Diagnóza u těchto žen je založena na klinických vlastnostech, což je nejčastěji progresivní spastická paraparéza a také podle panelu laboratorních testů. [19, 36]

Především kvůli rozmanitosti klinických projevů X-ALD je nezbytná přesná laboratorní diagnostika. Jako u mnoha genetických onemocnění je důležité identifikovat nejen postižené jedince, ale i heterozygotní nositelky. Jsou provedeny rozsáhlé testy, v současné době je sekvence biochemických, imunologických a molekulárně biologických analýz. Hlavní diagnostika spočívá v měření mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v plazmě spolehlivými diagnostickými testy, především pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, převážně se stanovuje zvýšení plazmatické hladiny kyseliny cerotové (C26:0) a zároveň i její zvýšení v poměru C26:0/C22:0. Biochemicky lze potvrdit diagnózu měřením plazmatického celkového lipidu VLCFA, dříve pomocí počítačové tomografie a později MRI. Pro diagnostiku X-ALD jsou velmi důležité zobrazovací techniky, dále je používána počítačová tomografie (CT), která detekuje změny, ale užitečnější je magnetická rezonance (MR), která dokonce identifikuje abnormality. Dále se X-ALD detekuje pomocí vyšetření sluchových evokovaných potenciálů (ABEP) a také pomocí vyšetření zrakových evokovaných potenciálů (VEP). [16, 23, 37, 38]

3.6.1. Zobrazovací technika

Zobrazovací technika patří mezi jedny z nejdůležitějších metod diagnostiky X-ALD, pomáhají vybrat kandidáty na transplantaci kostní dřeně, a to podle rozsahu demyelinizace u pacienta, dále jsou důležité při hodnocení výsledků léčby. Mezi zobrazovací techniky řadíme magnetickou rezonanci (MR) a výpočetní (počítačovou) tomografii (CT). Magnetická rezonance dokáže odhalit abnormality, především ty, které předcházejí neurologickým klinickým příznakům. MR identifikuje až v 80 % případech dětské ALD formy změny v bílé hmotě. Typické změny jsou v perivaskulární bílé hmotě a jsou symetrické léze. Tyto léze jsou také v parientálních a okcipitálních lalocích. Hypertenzivní léze jsou při T2 vážení v MR obraze. Je podána kontrastní látka gadolonie, která se hromadí v T1 vážení před hypodenzními lézemi, dochází ke korelaci s histopatologickými zónami demyelinizace a k parciální ztrátě myelinu. Výpočetní tomografie neboli CT detekuje změny mozku, zobrazuje bilaterální hypodenzitní léze v uvedených oblastech. Jako další zobrazovací techniky při diagnostice X-ALD MR difúzní tenzorové zobrazení. MR difúzní tenzorové zobrazení je neinvazivní metoda pro hodnocení difuzivity a směrovosti volných molekul vody. V bílé hmotě závisí difúze na orientaci stop bílé hmoty a na míře a integritě myelinizace. Měření se provádí v nejméně šesti nelineárních směrech prostoru, ale jednotnější vzorkování ve větším počtu směrů zamezuje zkreslení směru vzorkování a zvyšuje přesnost kvantifikace tenzoru difúze. Poskytuje poté orientační průměrovanou míru difúze vody a stupeň difúzní anizotropie. Diagnostikování

pacienti s X-ALD se musí pravidelně sledovat, a to prostřednictvím magnetické rezonance (MR), která monitoruje progresi onemocnění v centrální nervové soustavě pomocí „Loes score“. U pacienta nám „Loes score“ uskutečňuje porovnávat změny tkáně mozku při pravidelných vyšetřeních. Pro léčbu transplantací kostní dřeně a také hematopoetických kmenových buněk je optimální hodnota „Loes score“ do 4. U pacientů, kteří mají hodnotu „Loes score“ vyšší jak 4, je tento druh léčby méně vhodný. [23 ,24, 40, 41, 42]



Obrázek 5. - Snímek magnetické rezonance se stabilní lézí ve splenu u pacienta s X-ALD. Jsou zobrazeny axální (A) a sagitální T1 (B) vázané protony. Převzato z [4]

3.6.2. Molekulárně-genetická diagnostika

Při molekulárně-genetické diagnostice X-ALD je zahrnuta sekvenční analýza všech exonů ABCD1 genu. V případě, že je u pacienta potvrzena mutace, která je již známá, je možné využít i metodu polymerázové řetězové reakce (PCR) a následnou restriční analýzou (RFLP). První mutace byla přesně stanovena pomocí přístupu RNA na bázi RT-PCR a byla potvrzena pomocí DNA periferní krve. Mezi další screeningové metody, které jsou schopné určit mutovaný úsek genu patří například denaturační vysokorozlišovací kapalinová chromatografie (dHPLC) a konformační polymorfismus jednovláknové DNA (SSCP). Přítomnost homologů ABCD1 genu na autozomech jsou komplikací při využívání DNA diagnostiky u pacientů a přenašečů s X-ALD. Vzhledem k velikosti ABCD1 genu a širokého spektra mutací, je jako nejvhodnější metodický přístup, při kterém se informace z mRNA přepisuje pomocí enzymu rezervní transkriptázy do kopie DNA (cDNA), kdy se pomocí PCR amplifikuje menší počet

delších úseků genu. Proto se například u X-ALD namísto 10 úseků může amplifikovat a sekventovat jenom 4 fragmenty. [23, 47]

Pro stanovení je odebrána periferní krev, přičemž RNA je izolována z 1,5 až 3 ml krve pacientů se soupravou Qiagen. Vzhledem k tomu, že mRNA z genu ABCD1 je dlouhá 3,7 kB a s 2238 bp kódujícími sekvencemi, následoval dálkový protokol RT-PCR. Pro potvrzení určené mutace je u DNA periferní krve provedena PCR amplifikace segmentu zahrnujícího místo mutace a následná analýza produktu PCR sekventováním, restrikcí štěpením například pomocí dHPLC. [47]

U heterozygotních nositelů je diagnostika komplikovanější, jelikož u některých heterozygotů nejsou hodnoty VLCFA v plazmě zvýšeny. Tudíž jsou doporučeny molekulární studie, aby se u těchto jedinců potvrdila X-ALD. K identifikaci heterozygotů s X-ALD je používána nepřímá imunofluorescenční mikroskopie pro ALDP v mononukleárních krevních buňkách z periferní krve. U heterozygotních žen s X-ALD se objevují mozaikové vzorce pozitivních a negativních buněk. Pacienti s X-ALD nevykazují v přípravě mononukleárních buněk detekovatelnou imunoreaktivitu a jejich kožní fibroblasty jsou negativní na ALDP. [38, 48]

3.6.3. Prenatální diagnostika a novorozenecký screening

V první řadě se u prenatální diagnostiky X-ALD stanovuje pohlaví plodu, kdy se v matčině krvi detekuje Y chromozom. Při prenatální diagnostice se využívají jak biochemické, tak molekulárně-genetické metody. Biochemické metody stanovují koncentraci VLCFA v amniocytech a choriových klících, ale také stanovují schopnosti metabolizovat značené substráty v choriových klících nebo kultivovaných amniocytech. Mezi molekulárně-genetické metody patří sekvenční analýza DNA a také selektivní důkaz už určené mutace. [23, 48]

V roce 1962 byl zahájen rutinní novorozenecký screening dědičných metabolických poruch, což přineslo velký úspěch v časně diagnostice. V únoru 2016 byla v USA přidána adrenoleukodystrofie k doporučení jednotnému screeningovému panelu, což je federální seznam všech genetických chorob doporučených pro státní screeningové programy pro novorozence. Zda je tento screening prováděn, je věcí národní politiky a závisí na etických úvahách. Screening u novorozence umožňuje identifikaci dříve než se u jedinců s X-ALD rozvinou neurologické příznaky a díky tomu může být terapie co nejrychleji zahájena. Již při

narození je hodnota VLCFA v plazmě zvýšena, provedení novorozeneckého screeningu by mohlo vést k efektivnější diagnostice této závažné nemoci [19, 20, 27, 49]

Prenatální molekulární diagnostika u nositelek genu X-ALD je pod ultrazvukovým monitorováním provedena aminocentéza v 16-28 týdnu těhotenství. Je odebráno až 40 ml plodové vody, která je rozdělena na dvě části. Jedna část je centrifugována a zbytky jsou použity přímo k izolaci genomové DNA. Zbytek z druhé části je resuspendován v 5-10 ml kultivačního média a buňky plodové vody jsou kultivovány 10 až 15 dní za běžných podmínek. Novorozenecký screening je prováděn ze suché kapky krve, která je odebrána během prvního týdne života. Je provedena tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) z krevního papírku pro screening novorozence. Jelikož je laboratorní diagnostika komplikovaná, je potřebné tuto diagnostiku provádět ve vybraných centrech, které na vysoké úrovni poskytují komplexní diagnostický a následně terapeutický servis. Provádí se i kapalinná chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, kdy se měří 1-hexakosanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-fosfocholin (26:0-lyso-PC) ve vysušených krevních skvrnách. U jedinců postižených X-ALD jsou koncentrace lipidového markeru 26:0-lyso-PC až pětkrát vyšší, než jsou koncentrace u zdravých osob. Dostupnost LC-MS/MS nabízí velký potenciál při identifikaci X-vázané adrenoleukodystrofie a to i hned po narození. V současné době probíhají studie, které se zaměřují na modifikaci techniky LC-MS/MS, která by zajistila podstatně vyšší propustnost extraktů krevních skvrn, aby bylo možno denně provést i několik stovek analýz vzorků. Tato rychlá identifikace umožňuje co nejrychlejší zahájení terapie v případě prokázání X-ALD u pacienta. [19, 49, 50, 51, 52]

3.6.4. Biochemická diagnostika

Při laboratorní diagnostice se využívají veškeré abnormality a změny provázející se v postiženém organismu. U peroxizomálních onemocnění ze změn v biochemických parametrech se nejčastěji využívá v diagnostice akumulace VLCFA v tělních tekutinách. Mezi standartní postupy v diagnostice u pacientů s X-ALD je vyšetření VLCFA v jejich plazmě nebo séru. Tato diagnostika se provádí, protože X-ALD se biochemicky projevuje hlavně výrazným zvýšením plazmatické hladiny kyseliny cerotové (C26:0) a zvýšeným poměrem kyseliny cerotové s kyselinou behenovou (C26:0/C22:0) a také zvýšeným poměrem kyseliny lignocerové s kyselinou behenovou (C24:0/C22:0). Většina pacientů s X-ALD mají zvýšené všechny tři složky, jen v malém počtu případů je hodnota jednoho nebo dvou parametrů v normě. K biochemické diagnostice akumulace VLCFA se nejčastěji používá metoda plynové

chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). K vyšetření VLCFA lze také využít rychlejší a specifitější metodu, nežli je kapalinová chromatografie, touto metodou je například ultra výkonná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS). Analýza mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem je také možná v kultivovaných kožních fibroblastech, kdy lze i měřit rychlost oxidace VLCFA v kožních fibroblastech. Pokud jsou koncentrace kyseliny cerotové a její poměr s kyselinou behenovou zvýšené, analýza plazmy se opakuje. Pacient nesmí před stanovením jíst jídlo obsahující velké množství VLCFA, zejména tukové mléčné výrobky a arašídy. Za spolehlivou biochemickou diagnózu lze proto stanovit pouze u kultivovaných fibroblastů získaných z biopsie kůže, což je dost časově náročný a nákladný postup. Expres ALDP může být také ve fibroblastech zkoumána nepřímou imunofluorescenční mikroskopií. [16, 17, 23, 38, 43]

Diagnostika u pacientů s X-ALD je založena na akumulaci VLCFA, které se nachází v bílé hmotě mozkové a ve frakci esterů cholesterolu kůry nadledvin. Mastné kyseliny, které se akumulují, mají většinou délku řetězce mezi 20 až 32 uhlíky, nejčastěji se jedná o kyselinu lignocerovou (C24:0) a kyselinu cerotovou (C26:0). Zvýšené hodnoty VLCFA se nacházejí v plazmě pacientu s X-ALD, ale také u heterozygotních nositelů. 15 % žen s X-ALD má normální plazmatické hodnoty VLCFA, z toho důvodu je u žen s X-ALD diagnostickým testem mutační analýza genu ABCD1. [16, 19, 45]

Analýza se provádí z venózní krve, které se odebere 5 až 10 ml do zkumavek s heparinem. Plazma se oddělí do 2 hodin a poté se zmrazí na -10°C . Odběr venózní krve je prováděn na lačno ráno. V případě že je krev odebrána jinde, jsou poslány v nádobách naplněnými suchým ledem. Poté jsou připraveny methylestery mastných kyselin, které jsou vyčištěny a rozpuštěny ve 100 μl hexanu. Následně se provede analýza pomocí GC-MS. [23, 45]

Byla provedena studie, ve které byly nahrazeny kultivované fibroblasty při diagnostice X-vázané adrenoleukodystrofie buňkami periferní krve. VLCFA byly analyzovány v leukocytech od pacientů s X-ALD pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). V připravených mononukleárních krevních buňkách od pacientů s X-ALD byla provedena imunofluorescence pro ALDP, o kterých je známo, že jsou ALDP negativní ve fibroblastech. Bylo zjištěno, že stanovení VLCFA pomocí GC-MS v kombinaci s ALDP imunofluorescencí v buňkách periferní krve poskytuje rychlou a minimálně invazivní diagnostickou metodu pro zjištění X-ALD, která je na rozdíl od analýzy plazmy nezávislá na

zaživacích vlivech a obsahu VLCFA v potravě před analýzou. Identifikaci heterozygotů výrazně zlepšilo společné hodnocení leukocytů a plazmy. [16, 38]

Pro stanovení VLCFA lze použít i kapalinová chromatografie kombinovaná s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Je odebrán vzorek venózní krve do zkumavek s EDTA případně s heparinem, po oddělení plazmy se vzorek zamrazil na -20°C a byl skladován. LC-MS/MS je robustní technika s rostoucím využitím v klinických laboratořích. V případě, že není dosaženo vysoké propustnosti, lze použít činidlo DAABD-AE, kdy jeho hydrofobní povaha zvyšuje celkovou lipofilnost derivátů a tím zlepšuje separaci od sloučenin potlačujících ionty s rychlou elucí v běžně používané chromatografii na reverzní fázi. Ve srovnání s GS-MS je tato metoda s použitím činidla pětikrát až šestkrát rychlejší a šetří nejméně 75 % času nástroje. [44, 46]

3.7. Výskyt a původ VLCFA

Hlavní biochemickou abnormalitou u X-ALD jsou zvýšené hladiny nasycených mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem, zejména kyselina cerotová (C26:0) a kyselina lignocerová (C24:0). Akumulaci VLCFA lze nalézt ve všech tkáních, tělesných tekutinách a kultivovaných buňkách. Zvýšené plazmatické VLCFA nejsou pro X-ALD patognomické nebo mohou být dokonce falešně pozitivní kvůli hemolýze vzorku nebo kvůli dietním příčinám, například ketogenní stravě. Akumulace VLCFA je jedinou biochemickou abnormalitou, která je přítomna ve všech klinických variantách X-ALD, včetně presymptomatických jedinců. U heterozygotních žen je akumulace VLCFA snížena v porovnání s hemizygoty a může vést k falešně negativnímu stavu nosiče při vyšetřování krve. Lipidové inkluze jsou nalezeny ve vnitřních adrenokortikálních buňkách, testikulárních buňkách, Schwannových buňkách a mozkových makrofázích od pacientů s X-ALD. Inkluzná tělíska obsahují cholesterol, fosfolipidy, gangliosidy a estery mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem. Největší nadbytek byl zaznamenán ve frakcích lysofosfatidylcholinu, gangliozidu, fosfatidylcholinu a sfingomyelinu. [19, 25, 26]

VLCFA, které se hromadí u X-ALD, jsou většinou endogenního původu a jsou odvozeny ze stravy pouze v menší míře, většina je výsledkem endogenní syntézy prodloužením mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem kyseliny. U fibroblastů s poruchami biogeneze peroxizomu a X-ALD bylo pozorováno prodloužení mastného acylového řetězce. V důsledku zhoršené degradace VLCFA a nedostatečného importu VLCFA-CoA do peroxizomů se zvyšuje

syntéza VLCFA u pacientů s X-ALD. Syntéza nasycených VLCFA, mononenasycených VLCFA a polynenasycených mastných kyselin probíhá na endoplazmatické membráně čtyřmi odlišnými enzymy, a to prodloužením mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (ELOVL), 3-ketoacylCoA reduktázy, 3-hydroxyacyl dehydratázy a trans-2,3-enoyl-CoA reduktázy. Některé nové studie ukázaly, že tkáňové hladiny VLCFA přímo nekorelují s rychlostí peroxizomálního VLCFA β -oxidace a naznačují, že ABCD1 se nemusí přímo podílet na degradaci VLCFA. [25, 26]

VLCFA jsou extrémně hydrofobní a mají jiné fyziologické vlastnosti než mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Rychlost desorpce z biologických membrán klesá se zvyšující se délkou řetězce, desorpce C26:0 z fosfolipidové dvouvrstvé modelové membrány je 10 000krát pomalejší než desorpce mastných kyselin C16:0 a C18:0. Mikrokalorimetrické studie ukázaly, že zahrnutí C26:0 do modelové membrány narušuje membránovou strukturu. U pacientů s X-ALD je tím prokázáno, že je zvýšená mikroviskozita membrány v erythrocytech. Přebytek VLCFA změnil membránovou strukturu a potlačil dostupnost ACTH receptoru. [26]

3.7.1. Referenční rozmezí koncentrací VLCFA

Akumulaci VLCFA v krvi lze diagnosticky využít v X-ALD z plazmy nebo séra. Moser a kolegové zavedli diskriminační funkci založenou na měření C26:0 a dvou poměrech C26:0/C22:0 a C24:0/C22:0, aby se zlepšil rozdíl mezi hodnotami získanými u pacientů s X-ALD a kontrolních mužů a žen. Zvýšené hladiny kyseliny cerotové (C26:0) se nacházejí v celkovém referenčním rozmezí 0,15-1,9 $\mu\text{mol/l}$, hodnoty poměru C24:0 / C22:0 jsou v celkovém referenčním rozmezí 0,32-1,19 $\mu\text{mol/l}$ a hodnoty poměru C26:0 / C22:0 jsou v referenčním rozmezí 0,0-0,03 $\mu\text{mol/l}$ a jsou použité pro diagnostické účely. Využívanější alternativou pro stanovení VLCFA je použití 1-hexykosanosyl-2-lyso-sn-3-glycerofosfatidylcholinu ve vysušených krevních skvrnách. Hodnoty VLCFA jsou částečně ovlivněny současnou stravou, například ketogenní či vegetariánskou, přičemž vegetariáni mohou potenciálně vykazovat zvýšené hodnoty. U velkých skupin pacientů s X-ALD, s klinickou diagnózou X-ALD a u zdravých jedinců byly dříve měřeny hladiny VLCFA. Referenční rozsahy se však značně lišili, například hodnoty u kyseliny cerotové (C26:0) byly $0,66 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$, $1,3 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ a $0,3-1,9 \mu\text{mol/l}$ a pro poměr C26:0 / C22:0 byly uvedené referenční rozsahy $0,01 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$, $0,02 \pm 0,025 \mu\text{mol/l}$ a $0,02-0,025 \mu\text{mol/l}$. Referenční hodnoty však nejsou optimální pro hodnocení výsledků, protože podle definice má 2,5 %

zdravých kontrol hodnoty vyšší než dvě standardní odchylky. To znamená, že u všech 1000 testovaných kontrol mělo 25 jedinců zvýšené hodnoty VLCFA. [16, 77]

Tabulka 1. – Referenční rozmezí hodnot VLCFA u pacientů s X-ALD

Reference	Moser (1999)		Ronghe (2002)	Horn (2013)	Martinez (1994)	
Pacienti	n=1034 (hemi. muž)	n=379 (het. žena)	n.r.	n.r.	n=26	
C26:0 [μmol/l]	2,98±0,34	1,77±1,01	n.r.	n.r.	4,9±2,4	
Poměr C24:0/ C22:0	1,49±0,45	1,09±0,34	n.r.	n.r.	1,48±0,31	
Poměr C26:0/ C22:0	0,07±0,04	0,03±0,02	n.r.	n.r.	0,07±0,03	
ABCD1 mutace	Netestováno		Netestováno	Částečně testováno	Netestováno	
Kontroly	n=11,048 (muž)	n=7331 (žena)	n.r.	n.r.	n=27 (omni.)	n=4 (veg.)
C26:0[μmol/l]	0,66±0,38	0,66±0,38	0,33-1,39	0,3-1,0	1,3±0,4	2,2±0,9
C24:0/C22:0	0,86±0,22	0,85±0,20	0,32-0,90	0,49-0,91	0,82±0,08	1,08±0,11
C26:0/C22:0	0,01±0,02	0,01±0,01	0,0-0,03	0,006-0,021	0,02±0,01	0,02±0,01
Reference	Streck (2000)	Stellaard (1990)	Morell (2010)	Lagerstedt (2001)		
Pacienti	n.a.	n.a.	n.a.	n=1	Celkový rozsah	
C26:0[μmol/l]	n.a.	n.a.	n.a.	2,6	[0,76-7,30]	
Poměr C24:0/ C22:0	n.a.	n.a.	n.a.	1,46	[0,75-1,94]	
Poměr C26:0/ C22:0	n.a.	n.a.	n.a.	0,04	[0,01-0,11]	
ABCD1 mutace	n.a.	n.a.	n.a.	Netestováno		
Kontroly	n=22	n=21	n.r.	n=43	Celkové referenční rozsahy	
C26:0 [μmol/l]	0,15-0,39	0,22-1,31	0,3-1,9	0,3-1,3	[0,15-1,9] s veg. [0,28-3,1]	
C24:0/C22:0	0,66-0,94	0,32-1,19	0,3-1,1	n.r.	[0,32-1,19] s veg. [0,28-1,19]	
C26:0/C22:0	0,005-0,012	0,003-0,021	0,02-0,025	n.r.	[0-0,03]	

Tabulka uvádí referenční rozmezí hodnot VLCFA, které byly dříve publikovány pro dospělé pacienty s X-ALD (horní polovina) a zdravé kontroly (dolní polovina), sloupce znázorňují různé publikace. Referenční rozsah byl vypočítán s použitím

± SD (standardní odchylka) a poté ze všech referenčních hodnot vždy nejnižší a nejvyšší hodnota. Hemi. jsou hemizygotní, het. jsou heterozygotní, n.a. nepoužitelné, n.r. nenahlášeno, veg. strava je vegetariánská, omni. je normální. Převzato z [5]

Hladiny VLCFA ve vzorcích u pacientů s X-ALD jsou zvýšené. Referenční rozmezí u kyseliny cerotové (C26:0) je 0,15 - 0,91 $\mu\text{mol/l}$, referenční rozmezí kyseliny behenové (C22:0) činí 30,5 – 97,7 $\mu\text{mol/l}$ a kyseliny lignocerové C24:0 činí 24,4 – 69,9 $\mu\text{mol/l}$, dále referenční rozmezí poměru C26:0 / C22:0 je 0,00-0,022. [16, 78]

Tabulka 2. - Hladiny VLCFA a plazmatického cholesterolu u pacientů s X-ALD

	Věk	žena	muž	C22:0 [$\mu\text{mol/l}$]	C24:0 [$\mu\text{mol/l}$]	C26:0 [$\mu\text{mol/l}$]	poměr C24:0 / C22:0
Případy s X-ALD (n=34)	45,8±21,0 (2-77)	11	23	56,45±13,71 (37,3-93,3)	80,99±20,82 (48,24-121,91)	2,44±1,11 (0,25-4,10)	1,46±0,25 (0,95-2,04)
muži	43,6±23,3 (2-77)		23	52,75±11,46 (37,3-83,1)	83,29±20,68 (48,24-121,91)	2,79±0,91 (0,95-4,10)	1,55±0,21 (1,09-2,04)
ženy	50,5±15,3 (24-66)	11		63,86±15,34 (43,4-93,3)	76,38±21,29 (49,70-113,88)	1,75±1,18 (0,25-3,75)	1,25±0,20 (0,95-1,61)
Zvýšené VLCFA bez ABCD1 mutace (n=15)	56,1±10,8 (37-79)	8	7	99,30±27,29 (33,4-109,5)	90,42±15,48 (48,23-116,93)	0,99±0,58 (0,33-2,65)	0,96±0,21 (0,66-1,42)
	poměr C26:0 / C22:0	celkový cholesterol [mg/dl]	celkový triglyc. [mg/dl]	HDL [mg/dl]	LDL [mg/dl]		
Případy s X-ALD (n=34)	0,044±0,020 (0,005-0,082)	204±45,3 (129-281)	112,2±50,4 (43-255)	54,8±13,8 (28-90)	142,2±39,5 (67-207)		
muži	0,052±0,017 (0,019-0,082)	196±39,4 (129-253)	113,9±54,2 (43-201)	50,0±10,7 (28-21)	144,3±36,1 (81-207)		
ženy	0,025±0,013 (0,005-0,044)	219±54,7 (135-281)	109,0±46,4 (69-200)	63,1±15,4 (46-90)	138,7±47,6 (67-187)		
Zvýšené VLCFA bez ABCD1 mutace (n=15)	0,011±0,006 (0,003-0,024)	286±91,6 (198-514)	322,7±433,4 (60-1501)	58,7±15,9 (31-86)	152,2±34,2 (102-215)		

Tabulka zobrazuje hladiny VLCFA a plazmatického cholesterolu u pacientů s X-ALD a zvýšené případy VLCFA bez mutace ABCD1 genu. Data jsou uvedena jako průměr ± standardní odchylka, což se jedná o rozsah maximální – minimální hodnota. Převzato z [5]

3.8. Terapie

U onemocnění X-vázanou adrenoleukodystrofií není dostupná žádná kauzální léčba. Doposud jsou aplikované jen terapeutické možnosti jako je dietní, farmakoterapeutická, imunosupresivní léčba, transplantace krevní dřeně a genová terapie. Určení formy léčby u pacientů s X-ALD není jednoduché určit, pouze u nadledvinové nedostatečnosti je vždy

indikována substituční terapie kortikoidy. První léčba X-ALD spočívala v omezování požití VLCFA. Tato strava však dostatečně neuspěla, protože VLCFA se také produkují endogenně. Byla navržena dieta kombinující omezení VLCFA a požití mononenasyčené kyseliny olejové (GTO), která měla snížit koncentraci C26:0 o 50 % do 4 měsíců u pacientů s X-ALD. Poté se prokázalo, že směs kyseliny mononenasyčené kyseliny erukové (GTE) s glyceroltrioleátem (GTO) v poměru 4:1, nazývaný Lorenzo'sOil, kombinovaný s omezenou stravou VLCFA, normalizuje hladiny plazmy C26:0 do jednoho měsíce. Lorenzův olej je pojmenován po pacientovi Lorenza Odone, jehož rodiče zahájili vývoj tohoto terapeutického přístupu. Terapeutické studie s olejem GTO-GTE byly provedeny po celém světě a zahrnovaly více než 500 pacientů. Po několika letech studie byla zpochybněna účinnost léčby Lorenzovým olejem, protože jeho léčba nezabránila progresi již existujících neurologických příznaků. Účinnost této terapie u pacientů s X-ALD je stále sporná, ale i tak je stále využívána ke snížení VLCFA hladin v plazmě pacientů s X-ALD. [17, 20, 23, 53]

3.8.1. Lorenzův olej

U asymptomatických pacientů s X-ALD se doporučuje nejčastěji léčba Lorenzovým olejem, což je směs glycerolu-trioleátu s glycerolem-trierukátů v poměru 4:1, současně s dietou s nízkým obsahem lipidů. Dochází ke snížení hladin koncentrace VLCFA v plazmě, ale neovlivňuje postihnuté tkáně, tedy nezabraňuje neurologickým příznakům. Trombocytopenie je nežádoucím účinkem u léčby s Lorenzovým olejem a je pozorována u 50 % pacientů s X-ALD. U asymptomatických jedinců dochází během léčby s Lorenzovým olejem ke klinické stabilitě. Bylo sledováno, že u asymptomatických jedinců dietní léčba udržela mírnou neurologickou abnormalitu dlouho dobu stabilní. Včasné podání Lorenzova oleje snižuje frekvenci a závažnost následných neurologických nedostatků. Jakmile již proces začal, Lorenzův olej bohužel nezastaví demyelinizaci mozku. U terapie s Lorenzovým olejem poskytuje směs GTO-GTE zhruba 20 % celkového kalorického příjmu, což je zhruba 2-3 ml / kg. Další zdroje tuku poskytuje 10-15 % celkového kalorického příjmu. Jako doplňky stravy jsou poskytnuty esenciální mastné kyseliny, vitamíny a minerály. Počet krevních destiček, funkce jater a elektrokardiogram jsou monitorovány. U více jak 80 % asymptomatických pacientů s X-ALD, kteří dodržují dietu se významně snížily nebo normalizovaly hladiny plazmatické koncentrace VLCFA. Lorenzův olej vyžaduje přísné dodržování nízkotučné stravy s jeho implementací je pro pacienty často obtížná. Lorenzův olej se mu smíchat s džusem, nízkotučným jogurtem, pudinkem nebo mléčným koktejlem pro lepší chuť a jednodušší podání dětem. Při zahájení léčby Lorenzovým olejem jsou dávky postupně zvyšovány, doporučuje se

denní dávku si rozdělit po částech, ale samozřejmě může být přijata najednou. Pro obecné omezení VLCFA je doporučeny konzumace netučných mléčných výrobků, libové hovězí maso a vepřové, kuře bez kůže a nízkotučné ryby a k tomu samozřejmě ovoce a zeleniny. Mezi omezující faktory při léčbě Lorenzovým olejem u mnoha pacientů patří nevolnost a zvracení. V průběhu celé léčby je potřeba pečlivě sledovat počet krevních destiček. [20, 23, 53, 54]

3.8.2. Imunosupresivní léčba

Imunosuprese se podává za účelem zničení nebo snížení mozkové zánětlivé reakce, která je spojena w rychle progresivními mozkovými formami onemocnění. Rozsah závažnosti bílých změn v cerebrální formě onemocnění koreluje s mozkovou zánětlivou odpovědí zprostředkovanou dosud neznámými cytokiny nebo imunitními mechanismy. Všechny dosud provedené terapeutické studie k úpravě zánětlivé odpovědi neodhalily relevantní klinický přínos β -interferonu, cyklofosfamidu, cyklosporinu, imunoglobulinů, pentoxifyllinu a thalidomidu. Léčba cerebrální formy imunosupresivy s úvahou ovlivnit zápalovou složku procesu, a to vysokými dávkami cyklofosfamidu, thalomidem a dalšími nepřinesli očekávané zlepšení u pacientů s X-ALD. [17, 20, 23, 25]

3.8.3. Transplantace kostní dřeně

Mezi terapeutické postupy, které vedou k nejlepšímu efektu je transplantace kostní dřeně a hematopoetických kmenových buněk. První transplantace kostní dřeně u pacienta s X-ALD byla popsána v roce 1984. Mozkové makrofágy pacientů s X-ALD nejsou schopny odstranit a degradovat VLCFA, a proto pokračuje zánětlivá reakce. Mozkové makrofágy odvozené z kostní dřeně od dárce s normální funkcí peroxizomů jsou schopné zastavit mozkovou činnost demyelinizace. Bylo prokázáno, že transplantace kostní dřeně zvrátila nebo stabilizovala abnormality na mozkové MRI a může vest ke stabilitě duševních schopností. Hematopoetické buňky odvozené z kostní dřeně mohou vstoupit do centrální nervového systému. Mohou tedy tvořit perivaskulární makrofágy a mohou podstoupit transformaci na mikrogliální buňky. Dárcovské buňky tedy slouží jako exogenní zdroj korekčních faktorů. Dárcovské buňky mohou mít schopnost odbourávat VLCFA, nebo mohou poskytovat příznivou modifikující látku k prevenci forem mozkových chorob a možná i AMN. Trvalé štěpení buněk kostní dřeně poskytuje trvale obnovitelný zdroj nápravných faktorů, které mohou zastavit patologii mozku u pacientů s X-ALD. Protože mozková X-ALD je progresivní poruchu, proto lze u všech pacientů s demyelinizací očekávat další poškození myelinu, než dojde ke stabilizaci po transplantaci kostní dřeně. Většina pacientů, u kterých byla provedena transplantace kostní

dřeně, se zlepšili nebo stabilizovali, tedy pokud přežili. Pro nejvhodnější indikaci kostní dřeně je optimální, když má pacient s X-ALD IQ nejlépe vyšší 80, protože se zdá obtížné normalizovat hladinu IQ po transplantaci kostní dřeně. U mladších pacientů je vyšší riziko vzniku rychle progresivní formy onemocnění. Přestože transplantace kostní dřeně má stále relativně vysoké riziko úmrtnosti v současné době patří mezi jednu z trvalých léčeb. Pokud je úspěšná a zdá se být vhodnou léčbou pro pacienta, u nichž je prokázáno velmi rané postižení mozku a pro které je k dispozici vhodný dárce, jedná se tedy o trvalou léčbu. Identifikace presymptomatických pacientů, sériové a pečlivé sledování neuropsychologické a neuroradiologické studie jsou nezbytné pro zlepšení výsledků transplantace kostní dřeně pro pacienty s X-ALD. [20, 23,25,43, 57]

3.8.4. Genová terapie

Genová terapie je slibným kandidátem u pacientů s X-ALD, protože stav pacienta lze diagnostikovat roky před nástupem neurologického poškození. Gel byl izolován a bylo prokázáno, že lze opravit defekt v metabolismu VLCFA v buňkách X-ALD. Terapeutický úspěch transplantace kostní dřeně u pacientů s X-ALD ukázal, že onemocnění lze vyléčit nahrazením vadných hematopoetických kmenových buněk pacienta geneticky normálními kmenovými buňkami jiného jedince. Hlavním impulsem pro rozvoj somatické genové terapie je často marné hledání vhodně sladěného dárce. Jednou z možných strategií je ablace kostní dřeně následovaná autologní transplantací s geneticky korigovanými hematopoetickými buňkami vlastní kostní dřeně pacienta. Experiment ukázal, že zprostředkovaný přenos retrovirusovým transferem cDNA kódující ALDP obnovil peroxizomální β -oxidační metabolismus ve fibroblastech pacientů s X-ALD a hematopoetických kmenových buňkách, a právě tím začalo klinické hodnocení, ale stále není dostatek údajů o genové terapii. Dále je využívána u pacientů s X-ALD farmakologická genová terapie, kdy ABCD2 kódující ALDRP je nejbližší příbuzný peroxizomální transportér ABC, který sdílí 66 % aminokyselinovou identitu s ALDP. Po nadměrné expresi může ALDRP funkčně kompenzovat nedostatek ALDP u X-ALD fibroblastů. Endogenní hladina ALDRP však není dostatečná k prevenci X-ALD. Proto farmakologická stimulace ABCD2 exprese byla zaměřena jako alternativní terapeutická strategie pro X-ALD, vyžadující podrobné znalosti o tom, jak ABCD2 gen je transkripčně regulován. [20, 23, 25]

3.8.5. Pioglitazon a leriglitazon

Pioglitazon je léčivý přípravek, který se již několik let používá při léčbě diabetu. Předpokládá se, že bude vhodný k terapii u pacientů s ALD, funguje připojením a aktivací receptorů nazývaných „PPAR gama receptory“, které se nacházejí uvnitř nervových buněk. Pioglitazon by měl chránit nervové buňky před poškozením, zlepšuje funkce mitochondrií v nervových buňkách. Očekává se, že léčba pioglitazonem zpomalí progresi onemocnění. [34, 35]

Leriglitazon je nový orálně biologicky dostupný selektivní agonista PPAR gama s potenciálním profilem indikovaným pro onemocnění CNS. Je to metabolit pioglitazonu a má prokázanou dostatečnou penetraci mozku a příznivý bezpečnostní profil u lidí. Leriglitazon aktivací PPAR gama moduluje expresi genů zapojených do mitochondriální biogeneze, a proto obnovuje ztracenou energetickou rovnováhu, snižuje oxidační stres a obnovuje mitochondriální funkci způsobenou akumulací VLCFA. Zvyšuje expresi genů zapojených do diferenciaci oligodendrocytů podporující remyelinaci přežíváním a moduluje hladiny neurotropinu, což vede ke zlepšení přežití neuronů. Leriglitazon také interaguje se zánětlivou cestou aktivní v X-ALD, snížením aktivace makrofágů a následně neurozánětem. Také snižuje adhezi monocytů k endotelovým buňkám hematoencefalické bariéry. Leriglitazon je velkou nadějí při terapii u pacientů s X-ALD. [72, 73]

3.8.6. Hormonální substituční léčba

Hormonální substituční léčba nadledvin u pacientů s X-ALD by měla být povinná, protože může být život zachraňující. Primární adrenokortikální nedostatečnost je přítomna u více než 70 % pacientů s X-ALD. Hormonální substituce prospívá endokrinnímu stavu a obecně zlepšuje sílu a pohodu, ale neurologický stav se významně nemění. U hormonální substituční léčby dostávají dospělí pacienti s X-ALD dávku 25 mg kortizonacetátu nebo 20 mg hydrokortizonu ráno a druhou dávku 12,5 mg či 10 mg v pozdních odpoledních hodinách. U dětských pacientů je podáno 5 až 10 mg za 24 hodin. V případě psychického stresu a během fyzické zátěže by měli pacienti dávku glukokortikoidů zvýšit. [17, 23, 58]

3.8.7. Lovastatin

Úbytek buněčného cholesterolu je buďto vyčerpáním nebo léčbou snižující cholesterol, kterou umožňuje lék lovastatin a ten také normalizuje akumulaci VLCFA v lidských fibroblastech u pacientů s X-ALD. To poukazuje na zřejmý vztah mezi degradací VLCFA a

hladinami cholesterolu. Experimentálně bylo zjištěno, že lovastatin zvyšuje oxidaci C24:0 v kultivovaných fibroblastech u pacientů s X-ALD. Lovastatin se zdál prospěšným v terapii X-ALD, protože snižoval plazmatické hodnoty VLCFA u pacientů s X-ALD. Ve srovnatelné klinické studii s použitím simvastatinu, ale neproběhla normalizace VLCFA u pacientů s X-ALD. Za odlišný výsledek jsou považovány rozdíly v designu studie nebo v použití jiného statinu. Inhibitory HMG-CoA reductázy (statiny) byly studovány jako alternativní strategie pro snížení zátěže VLCFA v plazmě. Dalším použitím statinů jsou jejich protizánětlivé vlastnosti. Ačkoli se původně myslelo, že lovastatin snižuje VLCFA v průběhu čtyřtýdenního období u pacientů s X-ALD, tyto výsledky nebyly aplikovány a byly dále zpochybňovány studii využívající jiné statiny bez účinku. Byla provedena randomizovaná studie, dvojitě zaslepená placebem, zkřížená s podáním Lovastatinu v dávce 40 mg jednou denně. Byly měřeny hladiny kyseliny hexakosanové (C26:0) v plazmě, částice lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), lymfocyty, erytrocyty a plazmatický LDL cholesterol po dobu 22 týdnů léčby. Bylo zjištěno, že lovastatin vede k malému poklesu hladin C26:0 a C24:0 v plazmě, jedná se tedy o nespecifický výsledek. Tato studie tedy poukázala na to, že by lovastatin neměl být předepisován jako léčba ke snížení hladiny mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem u pacientů s X-ALD. Nadále probíhají další studie a vyšetření, aby bylo objasněno, zdali je lovastatin přínosnou terapií u pacientů s X-ALD. [23, 54, 58, 59,]

I když se v současné době terapie zlepšuje, nese stále svá rizika, její dlouhodobá účinnost není prokázána. Prevence zůstává nejvyšší prioritou a toho lze dosáhnout prostřednictvím genetického poradenství. Analýza mutací spolehlivě identifikuje heterozygotní ženy s X-ALD a analýza by měla být nabízena všem ženám, které jsou v ohrožení. Prenatální diagnóza kombinuje biochemickou, imunologickou a DNA analýzu, která je spolehlivá. [58]

3.9. Dietní terapie

Dietní terapie je určena k omezení příjmu mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem u pacientů s X-ALD. Dietní terapie vyžaduje pečlivý dohled multidisciplinárního týmu včetně odborníka na výživu, který zajistí, že hladiny VLCFA budou sníženy a tato nutriční rovnováha musí být zachována. Dietní terapie byla zahájena v roce 1980, po zjištění, že orálně podaná značená kyselina cerotová (C26:0), se hromadí v mozku u nevyлčitelně nemocného pacienta s adrenoleukodystrofií. Bylo tedy prokázáno, že akumulace VLCFA je alespoň částečně ve stravě. Dieta snižující příjem potravin bohatých na VLCFA však nedokázala snížit plazmatické koncentrace nasycených mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem. Na kožních fibroblastech

získaných od pacientů s X-ALD byla prokázána biosyntéza VLCFA. Kyselina olejová, mononasyčená mastná kyselina inhibuje systém prodlužování mastných kyselin, čímž se narušuje biosyntéza VLCFA. Normalizace plazmatické koncentrace VLCFA je dosaženo, když dietní omezení je kombinováno s perorálním doplněním Lorenzova oleje. [20, 33, 43, 53, 55]

Omezení příjmu kyseliny cerotové (C26:0) je až 3 mg denně, ve srovnání s obsahem 12-40 mg C26:0 v obvyklé stravě. Při dietní terapii je doporučeno aby 30-35 % kalorií pocházelo z tuku, z toho je 20 % z Lorenzova oleje, 5 % ořechového oleje a 10 % z ostatních dietních tuků. Dosažení nízkého příjmu je požadováno omezení tučných potravin, smažených potravin a plnotučných mléčných výrobků. Potraviny, které jsou bohaté na VLCFA a jsou nevhodné u pacientů s X-ALD jsou například rostlinné oleje z arašídů, kukuřice, sezamu, poté mastné ryby a maso, vnější obal ovoce a zeleniny, zrna a ořechy. Potraviny, které jsou bohaté na nasycené tuky, které jsou také nevhodné jsou například mléko a mléčné výrobky, máslo, mastné maso, žloutek, rostlinné oleje a průmyslové pečivo. Je doporučeno konzumovat potraviny s nízkým obsahem VLCFA jako je například libové drůbeží, hovězí, telecí, maso, dále nízkotučné mléko a mléčné výrobky (nízkotučné i polotučné jogurty, tvaroh, tvarohové sýry se sníženým obsahem tuku, tvrdý sýr (20 % tuku), zakysané mléčné nápoje), syrové ovoce a zelenina bez slupky, bílek od vejce, vhodná je žitná, ječná, pšeničná a jahelná mouka. Strava je doplněna také multivitamíny, minerály a dalším zdrojem esenciálních mastných kyselin, a to kyselinou linolovou a linolenovou, které se nacházejí například v šafránovém, vlašském oleji a rybím oleji. [53, 55, 56, 58]

Tabulka 3. – Obsah mastných kyselin v olejích a tucích v % z celkových mastných kyselin

Tuk nebo olej	SFA	MUFA	PUFA
Mléčný tuk	53-72	26-42	2-6
Sádlo	25-70	37-68	4-18
Kokosový tuk	88-94	5-9	1-2
Kakaové máslo	58-65	33-36	2-4
Hovězí tuk	47-86	40-60	1-5
Olivový olej	8-26	54-87	4-22
Sójový olej	14-20	18-26	55-68
Slunečnicový olej	9-17	13-41	42-74
Řepkový olej	5-10	52-76	22-40

Složení mastných kyselin v nejběžnějších olejích a tucích v % z celkových mastných kyselin. SFA (nasycené mastné kyseliny), MUFA (mononenasycené mastné kyseliny), PUFA (polynenasycené mastné kyseliny). Převzato z [6]

Tabulka 4. – Obsah C26:0 v běžných potravinách mg na 100 g.

Obsah C26:0 v potravinách (mg/100 g)		
Skupina potravin	Potravina	Naměřené hodnoty C26:0 (mg/100 g)
Másla a oleje	Arašídové máslo	63,46
	Máslo	34,87
	Kukuřičný olej	24,63
	Slunečnicový olej	8,14
	Majonéza	6,26
Ořechy a semínka	Arašídy	119,329
	Sezamové semínka	18,504
Mléko a mléčné produkty	Zrající sýr	16,42
	Zmrzlina	5,987
	Jogurt	1,61
	Mléko	0,381
Přílohy	Bílí chléb	4,064
	Bílá rýže	2,385
Maso	Kuřecí kůže	2,458
	Hovězí s tukem	1,06
	Vepřové s tukem	0,638
Ryby	Makrela	0,95
	Tuňák	0,227
Ovoce a zelenina	Banán	1,79
	Rajče	0,098
Pochutiny	Bramborové chipsy	9,64
	Mléčná čokoláda	6,19

V tabulce jsou znázorněny naměřené hodnoty C26:0 v běžných potravinách v mg na 100 g. Převzato z [7]

4. CHROMATOGRAFIE

Chromatografie patří mezi separační techniky a je považována za jednu z nejvýznamnějších technik. Jednotlivé složky jsou stanoveny kvalitativně a kvantitativně. Chromatografické metody dělí složky směsi na základě jejich rozdílných vlastností. Využívá se dělení složek mezi 2 fázemi, stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Chromatografickým systémem se pohybuje mobilní fáze a vzorek převádí do stacionární fáze, tím nastává separace analytu, kdy se jednotlivé části analytu uchytní ve stacionární fázi. Stacionární fáze může být tvořena pevnou látkou nebo kapalinou, která je zachycena na nosiči. Mobilní fáze může být tvořena kapalinou či plynem. [60, 61]

Je několik druhů chromatografie, mezi nejjednodušší metody spadá papírová a tenkovrstvá chromatografie, dále jsou metody, které využívají nákladnější zařízení, zde spadá plynová nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Všechny typy chromatografických metod využívají stejné základní principy. Dnes jsou používány speciální metody, jako je chromatografie afinitní, ionexová a gelová permeační, ale také klasické, kam spadá adsorpční a rozdělovací chromatografie. K diagnostice koncentračních hodnot VLCFA v plazmě,

zejména kyseliny hexakosanové (C26:0) je využívána plynová chromatografie a také chromatografie na tenké vrstvě. Lipidy jsou také chromatograficky identifikovány. Kdy dochází k separaci složek lipidů a nejčastěji pro diagnostiku lipidů je využita tenkovrstvá chromatografie. Derivatizace je velmi důležitá při plynové chromatografii. [60, 61]

4.1. Derivatizace

Derivatizace zvyšuje citlivost, rozlišení, umožňuje detekci a separaci látek. U plynové chromatografie je derivatizace nezbytná. Nejen že umožní detekci a separaci, ale také zamezí nežádoucí sorpci látek na koloně. Derivatizace je pokolonová, kdy nejsou provedeny změny v chromatografickém procesu a také předkolonová derivatizace, která umožňuje změny v chromatografickém procesu. Cílem derivatizace je dosažení kvalitních nových vlastností u separovaných látek, které umožňují separaci. U chromatografických technik jsou vždy jiné požadavky na připravené deriváty. V kapalinové chromatografii s plošným uspořádáním je požadováno, aby původní látky byly těkavější, než vznikající deriváty u plynové chromatografie je tomu naopak a vzniklé deriváty jsou těkavější než počáteční látky. [63, 64]

U plynové chromatografie umožňuje derivatizace připravit methylestery mastných kyselin (FAME). FAME jsou připraveny bazicky či kysele katalyzující esterifikací. U derivatizace jsou použita derivatizační činidla. U methanolýzy, která je bazicky katalyzovaná je nejčastěji použito KOH nebo NaOH. Kysele katalyzovaná esterifikace často využívá HCl, dále pak H₂SO₄ a BF₃. [62]

4.2. Tenkovrstvá chromatografie

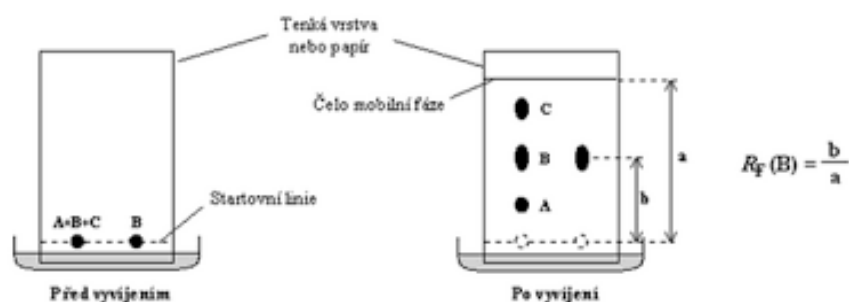
Tenkovrstvá chromatografie je velmi účinná chromatografická metoda. Hlavní výhodou této separační metody je její jednoduchost, nízká cena a flexibilita. Princip této metody je založen na rozdělení směsi na jednotlivé složky, a to v důsledku jejich odlišných interakcí se sorbetem. Na pevné podložce je v tenké vrstvě nanesen sorbet (stacionární fáze). Mobilní fází je organické rozpouštědlo o ideální polaritě, například hexan, aceton nebo metanol. Tenká vrstva stacionární fáze je buďto fixovaná nebo volně vysypaná sorbetem. Jako stacionární fáze je využíván především silikagel (sulfol), alufol (Al₂O₃), celulóza, také některé polyamidy a křemeliny. Vrstvy jsou vytvořeny rozmístěním suspenze sorbetu ve vodě a připraveny na vhodnou podložku, nejčastěji je využito mikroskopické podložní skličko, hliníková folie či plastová folie. Tenká vrstva je fixovaná za použití vhodného pojiva, nejčastěji je používán škrob a sádra. [60, 65]

Chromatografie začíná až po úplném vysušení nalité vrstvy. Zkoumaný vzorek je pomocí kapiláry či automatického aplikátoru nanese v tenké vrstvě na označenou startovací čáru na podložní sklíčko či hliníkovou folii. Je možné současně stanovit i několik vzorků, ty jsou nanášeny v dostatečné vzdálenosti vedle sebe na startovací čáře. Po následném zaschnutí nanášených vzorků se destička vloží do vyvíjecí komory, kde je rozpouštědlo. Nanášený vzorek nesmí být ponořen v kapalině, ale aby vztlínáním postoupilo rozpouštědlo do úrovně startovací čáry. Rozpouštědlo vztlíná silikagelem vzhůru, mobilní fáze při vztlínání přichází do kontaktu s látkami ve skvrně a dochází k separaci na povrchu destičky. Po dobu vztlínání rozpouštědla, musí být chromatografická komora těsně uzavřena, aby nedošlo k úniku par, které jsou schopné nepříznivě ovlivnit průběh separace. Separace je ukončena zhruba když mobilní fáze je 1-2 cm od okraje destičky. [60, 61, 66]

Po ukončení separace se destička s tenkou vrstvou vytáhne z vyvíjecí komory a nastává vyhodnocení chromatogramu. U vyhodnocení barevných látek je poloha získané stopy přímo vidět, případně více stop, když se jedná o směs více barevných látek. Pokud jsou látky bezbarvé, musí se jejich stopy zviditelnit detekcí. V případě použití silikagelu nebo oxidu hlinitého, který je volně sypaný nebo fixovaný na vrstvě se sádrou, tak se dá využít vypálené vrstvy na elektrickém vařiči. Dochází ke zhnědnutí v místech s organickou netěkavou látkou. Před vypálením se také využívá postřík vrstvy 10 % H_2SO_4 , který urychlí a zvýrazní proces. V případě, že je použit škrob jako pojivo, tato metoda se nedá využít, jelikož při vypalování ztmavne celá plocha destičky. Detekce se provádí i ozářením UV světlem po použití adsorbentů, které obsahují fluorescenční indikátor. Tmavé skvrny na světlém pozadí se objeví v případě, že skvrny obsahují látky absorbující ultrafialové záření. V případě, že analyzované látky neabsorbují ultrafialové záření lze vyvinutou destičku postříkat roztokem morinu a po následném usušení se skvrny identifikují pod UV lampou a na fluoreskujícím pozadí se zobrazují odlišné barvy. [60, 65, 66]

U analýzy na tenké vrstvě, určuje vzdálenost skvrny polarita látky a také polarita rozpouštědla. Látky, které jsou polárnější se více zadržují polárními skupinami stacionární fáze. Větší vzdálenost urazí látky o dané polaritě, jestliže se použije rozpouštědlo o vyšší polaritě. Tvar a vzdálenost skvrny je také ovlivněna rozpustností látek v mobilní fázi. Látka urazí na vyvíjecí destičce za použití vhodného rozpouštědla vzdálenost, která je nepřímo úměrná polaritě látky a je udána pomocí retardačního faktoru R_F (retenčního). Jedná se o bezrozměrnou

veličinu, která je také dána rovnicí, kdy retardační faktor je dán poměrem vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti od startu po konec vztlínání. [60, 65]



Obrázek 5. – Tenkovrstvá chromatografie. Vyhodnocení chromatogramu a rovnice retardačního faktoru R_F .
Převzato z [8]

4.3. Plynová chromatografie (GC)

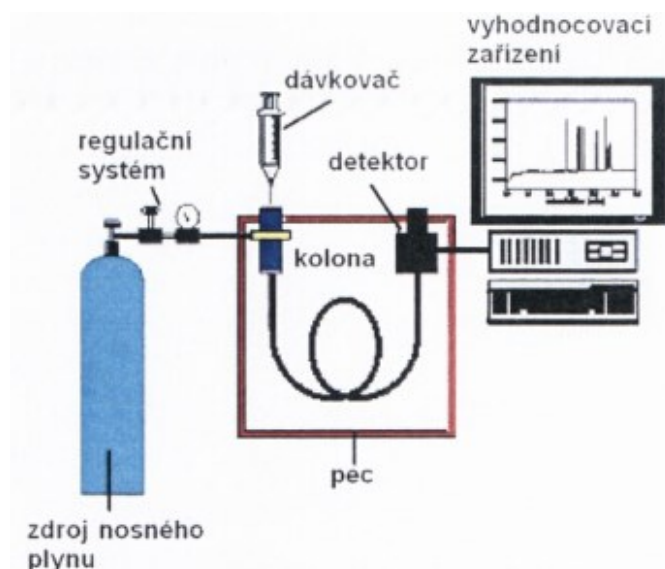
Plynová chromatografie je separační metoda, která dělí směsi látek s rozdílným bodem varu a rozdělovacím koeficientu. Dochází k rozdělení koncentrací analytu mezi mobilní fází (nosný plyn, eluent či inertní plyn) a stacionární fází (sorben) při současné adsorpci a rozpouštění. Mobilní fází tvoří plyn a jako zdroj jeho pohybu je využit tlakový spád, přičemž stacionární fáze je členěna v koloně. Plynová chromatografie využívá kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení analytu, přičemž celý průběh je sledován měřícím zařízením. Plynový chromatograf je složen ze zdroje nosného plynu, regulačního systému, dávkovače, pece, kolony, detektoru a také vyhodnocovacího zařízení. [66, 67]

Vzorek je dávkován do proudu plynu, kde je dále unášen kolonou. V případě tuhého vzorku je provedeno rozpuštění v těkavé kapalině a látky, které mají vysoký bod varu jsou převedeny na deriváty. Vzorek je umístěn do uzavřené skleněné lahvičky a je vyhříván na zvolenou teplotu. Těkavé látky přecházejí do plynné fáze a oddělují se od biologického materiálu. Plyn je unášen do kolony kde se složky separují podle vázat se na stacionární fázi. Složky, které opustí kolonu jsou indikovány detektorem a jeho signál se vyhodnocuje. Časový průběh signálu určuje druh a kvantitativní zastoupení látek ve vzorku. [66, 67]

4.3.1. Nosný plyn

V plynové chromatografii je pohyblivou fází nosný plyn. Hlavní úlohou nosného plynu je transport složek kolonou, přičemž se nosná plyn sám neúčastní separačního procesu. Vzorek je nastříknut do nástřikové komory, kde je proud nosného plynu. Nosný plyn pak dále unáší

páry vzorku do kolony. Nejčastěji je jako nosný plyn používán vodík, dusík, argon a helium. Pro kapilární kolony je nevhodnější helium, jelikož má největší celkovou účinnost. Pro vysokorychlostní plynovou chromatografii je nejčastěji využíván vodík. Volba nosného plynu je velmi důležitá a využívá se vhodných faktorů, jako je viskozita, čistota, reaktivita, účinnost, cena plynu a typ použitého detektoru. Čistící zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu a také z něj odstraňuje nežádoucí stopy ostatních plynů. [67, 69]



Obrázek 7. - Schéma plynového chromatografu. Převzato z [9]

4.3.2. Regulační systém

Elektrická regulační zařízení regulují tlak a průtok nosného plynu. Průtok nosného plynu lze pomocí regulačního systému vhodně nastavit společně také s tlakem na koloně a splinovacím poměrem. Bez ohledu na typ nosného plynu, rozměr kolony a teplotu nám regulátor průtoku umožňuje konstantní průtok plynu kolonou a detektorem. Průtok plynu kolonou může být konstantní a z toho důvodu je tlak automaticky nastavený nebo průtok může být programově se měnící. Je několik druhů regulátorů, například regulátory konstantního vstupního tlaku, regulátory konstantního hmotnostního průtoku, mechanické regulátory a elektrické regulátory. [68, 69, 70]

4.3.3. Dávkovací zařízení

Dávkovač neboli injektor je využíván k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Provedení dávkování musí být rychlé a vzorek musí být po nástřiku okamžitě odpařen. Z tohoto důvodu je nástřiková komora zahřívána. Dávkovač musí splňovat všechny požadavky, jako

například, že vzorek vstupující na kolonu musí mít co nejmenší objem, nesmí docházet k diskriminaci komponent vzorku, nesmí dojít k rozkladu vzorku v dávkovači během odpaření. Vzorek je dávkován v objemu 0,1 - 20 μl , pomocí injekční mikrostříkačky, a to přes silikonovou pryž (septum). Pro kapilární kolony je i takto nepatrná dávka velká, proto se je mocí děliče toku její určitá část společně s nosným plynem odpouštěna a pouze minimální část množství se dostává do kolony. Je prováděno několik metod nástřikování, například nástřik do kolony, nástřik pomocí děliče toku a dále nástřik bez děliče toku. Důležitý výběr dávkovací metod je především u kapilárních kolon, jelikož se jedná o rozhodující faktor pro provedení kvalitní separace. Pro tenčí kapilární kolony je využíván především nástřik pomocí děliče toku, jelikož mají malou kapacitu. [67, 70, 71]

4.3.4. Termostat

Pomocí termostatu je dosaženo vysoké teploty, která je potřebná pro dávkovač, detektor a kolonu. Vzorek musí být udržován v plynném stavu, proto je nutná vysoká teplota. Analýza vzorku je prováděna při teplotách mezi 50-300 $^{\circ}\text{C}$. Kolona je uložena v termostatu a představuje také největší objem celého chromatografu. [71]

4.3.5. Kolony

Kolona tvoří část chromatografu, kde je uložena stacionární fáze. V termostatu je uložena kolona a je temperována na požadovanou teplotu. Podle vytvořeného teplotního programu se teplota během analýzy může měnit. V koloně dochází k separaci složek. Vyšší účinnost separace je poskytnuta kolonami s menším vnitřním průměrem a kolony s větším průměrem mají nižší účinnost, ale vyšší kapacitu. V plynové chromatografii je využíváno několika typů kolon, například náplňové kolony, kapilární kolony a mikronáplňové kolony. [67, 71]

Náplňové kolony jsou 1-3 m dlouhé trubice s vnitřním průměrem kolony 2 až 3 mm, jsou naplněné sorbety (silikagel, alumina) či nosiči pokrytými kapalnou fází (oxid křemičitý). Vyrobené jsou z oceli nebo skla a oproti kapilárním kolonou mají vyšší kapacitu. Kapilární kolony byly dříve vyráběny ze skla a oceli, v současné době se připravují z taveného křemene, který je potažen polyimidem. Jako nosiče stacionární fáze využívají své vnitřní stěny. Kapilární kolony mají vnitřní průměr kolon 0,1 až 0,6 mm, délka je v rozmezí 15 až 60 m a kapacita 50 ng až 15 μg . Ideální délka kolon je většinou 30 m. Vyšší účinnosti je dosaženo při použití

menších průměrů kolony, ale naopak je dosaženo nižší kapacity. Účinnost separace se snižuje v případě rostle-li tloušťka stacionární fáze a vnitřní průměr. [67, 70, 71]

4.3.6. Detektory

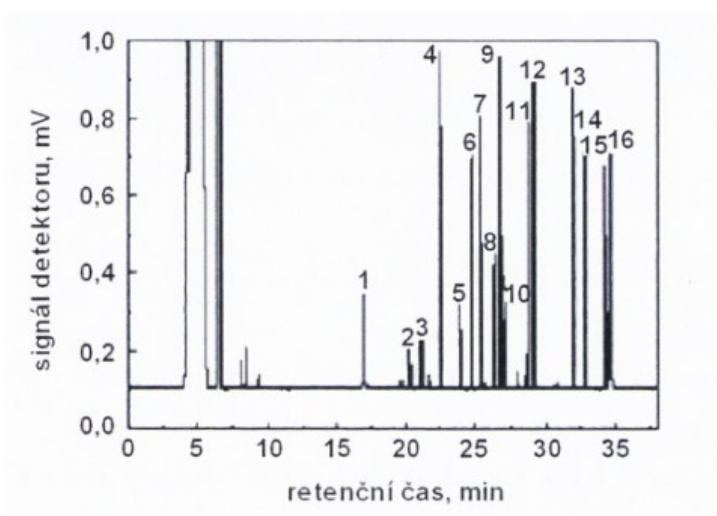
U detektorů v plynové chromatografii je nejdůležitější stabilita signálu v čase, rychlá odezva na složení a také velká citlivost. Nejmenší postřehnutelný obsah složky lze detekovat citlivějším detektorem. Vysoká selektivita pro stanovené analyty je důležitým požadavkem u detektoru. Separované složky opouštějí kolonu a dále prochází detektorem. Látky v nosném plynu jsou detekovány v detektoru, který je napojen na zapisovač. Detektor vyšle signál po přítomnosti složky v nosném plynu. V přítomné složce je indikována určitá vlastnost plynu, měřená vlastnost má vztah ke druhu a koncentraci složek ve vzorku. Při plynové chromatografii se využívá několik typů detektoru, například detektor tepelně vodivostní, detektor elektronového záchytu a plamenový ionizační detektor. [67, 70, 71]

Tepelně vodivostní detektor (TCD) pracuje na principu různých tepelných vodivostí plynů. Přes vlákno, které je žhavené konstantním elektrickým proudem, proudí nosný plyn. Změna tepelné vodivosti kolem žhavého vlákna potvrzuje přítomnost stanovené látky v nosném plynu a tím vlákno změní svou teplotu. Změna elektrického odporu je způsobená změnou teploty. Plamenový ionizační detektor (FID) je v plynové chromatografii považován za nejrozšířenější detektor. Před vstupem do hořáku se nosný plyn mísí s vodíkem. V kyslíkovodíkovém plamenu se ionizují molekuly plynu. Elektrický proud vedou ionty plynu mezi elektrodami. Elektrický proud se zvětšuje po přítomnosti složky a také se zvyšuje ionizace. U FID je nejčastěji využíván dusík jako nosný plyn. Detekuje se skoro vše, až na anorganické plyny a páry u organických látek nedochází k reakci na formaldehyd a kyselinu mravenčí. U detektoru elektronového záchytu (ECD) je zdrojem ionizující energie radioaktivní zářič ^3H či ^{63}Ni . K ionizaci dochází kolizí molekul dusíku s β zářením, mezitím dochází k uvolňování pomalých elektronů. Ionizační proud je snížen potom co elektronegativní atomy zachytí složky. Detektor je především citlivý na halogeny a sloučeniny které obsahují kyslík, olovo, fosfor a síru. [67, 70, 71]

4.3.7. Chromatogram

Vyhodnocení proudového signálu, který je převeden na napět'ovou odezvu se označuje jako chromatogram. Kdy je získán grafický záznam, na kterém je zobrazena závislost napět'ové

odezvy na čase. Vyhodnocení se provádí z chromatografické křivky, která je zakreslena z vyhodnocovacího zařízení po zpracování signálu z detektoru. [67, 71]



Obrázek 8. - Záznam chromatogramu. Převzato z [9]

5. ZÁVĚR

Adrenoleukodystrofie je nejběžnější peroxizomální porucha, jež se projevuje především neurologickým poškozením a dysfunkcí kůry nadledvin. ALD je způsobená mutací ABCD1 genu, jež je lokalizován v úseku Xq28. Mutace ABCD1 genu narušuje funkci ALD proteinu a kvůli jeho nedostatku dochází k porušení peroxizomální β -oxidaci. Porucha peroxizomální β -oxidace způsobuje akumulaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v plazmě a některých tkáních, jedná se zejména o kyselinu cerotovou (C26:0) a lignocerovou (C24:0).

U adrenoleukodystrofie je velmi důležité včas diagnostikovat onemocnění a zahájit následnou terapii. Diagnostika adrenoleukodystrofie je prováděna pomocí biochemických, imunologických a molekulárně genetických analýz. V bakalářské práci byla popsána molekulárně-genetická diagnostika, prenatální diagnostika, zobrazovací technika, novorozenecký screening a biochemická diagnostika. Přičemž podrobně byla popsána tenkovrstvá a plynová chromatografie.

V současné době není při léčbě adrenoleukodystrofie žádná kauzální léčba. Dříve byl nejvíce užíván při léčbě adrenoleukodystrofie Lorenzův olej, který snižuje hladiny VLCFA v plazmě pacientů s ALD, ale po několika letech studií je tato léčba zpochybňována a jeho léčba není již tolik aplikována. Největší efekt v terapii ALD má transplantace kostní dřeně a hematopoetických buněk a patří mezi jednu z trvalých léčeb. Dalším slibným kandidátem u léčby adrenoleukodystrofie genová terapie a také léčivé přípravky, které se využívají k léčbě diabetu, jako je konkrétně pioglitazon a leriglitzon.

Dietní terapie při léčbě adrenoleukodystrofie je určena k omezení příjmu mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem. I když VLCFA, které se hromadí u pacientů s adrenoleukodystrofií jsou převážně endogenního původu a ze stravy jsou odvozeny v menší míře, je dietní terapie přesto doporučována. Pacienti s adrenoleukodystrofií by měli vymezit příjem potravin s vysokým obsahem VLCFA, mezi tyto potraviny patří například rostlinné oleje z arašídů, sezamu, mastné maso, ořechy, tučné mléko, máslo a další. Ačkoliv akumulace VLCFA není primárně odvozena ze stravy, je vhodné dietní terapii dodržovat, aby se alespoň minimálně zamezilo příjmu VLCFA.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GROFOVÁ, Zuzana. Mastné kyseliny. *Medicína pro praxi* [online]. 2010, **7**(10): 388-390 [cit. 2021-2-15]. Dostupné z: https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-201008-0010_Mastne_kyseliny.php.
- [2] TVRZICKA, Eva, Lefkothea-Stella KREMMYDA, Barbora STANKOVA a Ales ZAK. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review part 1. *Biomedical Papers* [online]. 2011, **155**(2): 117-130 [cit. 2021-2-15]. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2011.038.html>.
- [3] DOSTÁLOVÁ, Jana. Tuky v potravinách a jejich nutriční hodnocení. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2011, **13**(9): 347–349 [cit. 2021-2-15]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-201109-0008_Tuky_v_potravinach_a_jejich_nutricni_hodnoceni.php.
- [4] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.). Jinočany: H & H, 2002, 872 s. ISBN 80-7319-013-3
- [5] KREMMYDA, Lefkothea-Stella, Eva TVRZICKA, Barbora STANKOVA a Ales ZAK. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review part 2. *Biomedical Papers* [online]. 2011, **155**(3): 195-218 [cit. 2021-2-15]. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2011.052.html>. ISSN 1213-8118.
- [6] ŽÁK, Aleš a Jaroslav MACÁŠEK. *Ateroskleróza: nové pohledy*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3052-3.
- [7] ZEHNÁLEK, Josef. *Biochemie*. Vyd. 2. nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005. ISBN 80-7157-840-1.
- [8] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [9] Metabolismus lipidů. *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. 2016 [cit. 2021-3-05]. Dostupné z:

https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLKBC0211p/um/Synteza_a_odbourani_mastnych_kyselin2016.pdf.

- [10] MASOPUST, Jaroslav a Richard PRŮŠA. *Patobiochemie metabolických drah*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 1999, 182 s. ISBN 80-238-4589-6.
- [11] Peroxizomy. *Institut Galenus* [online]. [cit. 2021-3-06]. Dostupné z: <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-bunka-peroxizomy>.
- [12] MONROIG, Óscar, Shugi WANG, Liang ZHANG et al. Elongation of long-chain fatty acids in rabbitfish *Siganus canaliculatus*: Cloning, functional characterisation and tissue distribution of Elov15- and Elov14-like elongases. *Aquaculture* [online]. 2012, **350**: 63-70 [cit. 2021-3-07]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.017>.
- [13] HARMEET, Singh, Nicholas DERWAS, Alf POULOS. β -oxidation of very-long-chain fatty acids and their coenzyme A derivatives by human skin fibroblasts, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [online]. 1987, **254**(2): 526-533 [cit. 2021-3-07]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90133-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90133-0). ISSN 0003-9861.
- [14] ŽMOLÍKOVÁ, Martina. *Diagnostika adrenoleukodystrofie pomocí plynové chromatografie*. Pardubice, 2016. 123 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce prof. Ing. Alexandr Čegan, CSc.
- [15] SIMOPOULOS, Artemis P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. [online]. 1999, **70**(3): 560-569 [cit. 2021-3-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.560s>.
- [16] RATTAY, Tim W., Maren RAUTENBERG, Anne S. SÖHN et al. Defining diagnostic cutoffs in neurological patients for serum very long chain fatty acids (VLCFA) in genetically confirmed X-Adrenoleukodystrophy. *Scientific Report* [online]. 2020, **10**: 15093 [cit. 2021-3-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71248-8>.
- [17] KOLNÍKOVÁ, M., P. SÝKORA, R. PETROVIČ et al. X-viazaná adrenoleukodystrofie. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2013, **76/109**(2): 197-202 [cit. 2021-3-20]. Dostupné z: <https://www.csmn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2013-2-5/x-viazana-adrenoleukodystrofia-40074>.

- [18] KUBOTA, Kazuo, Hiroki KAWAI, Shigeo TAKASHIMA et al. Clinical evaluation of childhood cerebral adrenoleukodystrophy with balint's symptoms. *Brain and Development* [online]. 2021, **43**(3): 396-401 [cit. 2021-3-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.11.010>.
- [19] ENGELEN, Marc, Stephan KEMP, Marianne de VISSER et al. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2012, **7**(1): 51 [cit. 2021-4-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3503704/#B13>.
- [20] MOSER, H. W. et al. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* [online]. 1997, **120**(8): 1485-1508 [cit. 2021-4-05]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/brain/article/120/8/1485/438189>.
- [21] History of ALD. *ALD info* [online]. 2021 [cit. 2021-4-05]. Dostupné z: <https://adrenoleukodystrophy.info/clinical-diagnosis/history-of-ald>.
- [22] ACHARYA, Shrikrishna V., Raju A. GOPAL, Tushar R. BANDGAR et al. Clinical profile of adrenoleukodystrophy. *Indian journal of pediatrics* [online]. 2009, **76**(10): 1045-1047 [cit. 2021-4-05]. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12098-009-0220-0.pdf>
- [23] CHANDOGA, Ján, Robert PETROVIČ, Ján FUTAS et al. X-viazaná adrenoleukodystrofia-najčastejšia dedičná metabolická porucha peroxizómov. *Neurologie pro praxi* [online]. 2006, **7**(2): 84-89 [cit. 2021-4-06]. Dostupné z: <http://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200602-0007.php>.
- [24] SEIDL, Zdeněk, Manuela VANĚČKOVÁ, Tomáš VITÁK et al. X-adrenoleukodystrofie – hodnocení lézí mozku modalitou magnetické rezonance pomocí "Loes score". *Česká radiologie* [online]. 2007, **61**(3): 275-278 [cit. 2021-4-15]. Dostupné z: <http://www.cesradiol.cz/detail.php?stat=122>. ISSN 1210-7883.
- [25] BERGER, Johannes, Jutta GÄRTNER. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* –

- Molecular Cell Research* [online]. 2006, **1763**(12): 1721-1732 [cit. 2021-4-15].
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.010>. ISSN 0167-4889.
- [26] KEMP, Stephan, Johannes BERGER a Patrick AUBOURG. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2012, 1822(9): 1465-1474 [cit. 2021-4-26].
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443912000774>.
ISSN 0006-3002.
- [27] Mutations and Biochemistry. *ALD info* [online]. 2021 [cit. 2021-4-26]. Dostupné z:
<https://adrenoleukodystrophy.info/mutations-biochemistry/mutations-biochemistry>.
- [28] DAS, Undurti N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal* [online]. 2006, **1**(4), 420-439 [cit. 2021-4-27].
Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.200600012>. ISSN
1860-6768.
- [29] FOURCADE, Stéphane, Montserrat RUIZ, Cristina GUILERA et al. Valproic acid induces antioxidant effects in Xlinked adrenoleukodystrophy. *Human molecular genetics* [online]. 2008, **19**(10): 2005-2014 [cit. 2021-4-29]. Dostupné z:
<http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2010/02/23/hmg.ddq082.short>. ISSN
0964-6906.
- [30] VARGAS, C. R., M. WAJNER, L. R. SIRTORI et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2004, **1688**(1): 26-32 [cit. 2021-4-29]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443903001674>. ISSN 0006-3002.
- [31] FOURCADE, Stéphane, Jone LOPÉZ-ERAUSKIN, Jorge GALINO et al. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Human molecular genetics* [online]. 2008, **17**(12): 1762-1773 [cit. 2021-4-29]. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddn085>. ISSN 0964-6906.

- [32] BERGER, J., S. FORSS-PETTER a F. S. EICHLER. Pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimie* [online]. 2014, **98**: 135-142 [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.023>. ISSN 0300-9084.
- [33] BERGER, Johannes a Jutta GÄRTNER. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2006, **1763**(12): 1721-1732 [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16949688/>. ISSN 0006-3002.
- [34] SINGH, Inderjit a Aurora PUJOL. Pathomechanisms Underlying X-Adrenoleukodystrophy: A Three-Hit Hypothesis. *Brain Pathology* [online]. 2010, **20**(4), 838-844 [cit. 2021-5-01]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3639.2010.00392.x>. ISSN 10156305.
- [35] Pioglitazone for the treatment of adrenoleukodystrophy. *European Medicines Agency* [online]. 2014 [cit. 2015-5-01]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2014/03/WC500164318.pdf.
- [36] Diagnosis od ALD. *ALD info* [online]. 2021 [cit. 2021-5-06]. Dostupné z: <https://adrenoleukodystrophy.info/clinical-diagnosis/diagnosis-of-ald>.
- [37] TURK, Bela R., Christine THEDA, Ali FATEMI et al. X-linked adrenoleukodystrophy: Pathology, pathophysiology, diagnostic testing, newborn screening and therapies. *International Journal of Developmental Neuroscience* [online]. 2020, **80**(1): 52-72 [cit. 2021-5-06]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jdn.10003>.
- [38] UNTERBERGER, Ursula, Günther REGELSBERGER, Regina SUNDT et al. Diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy in blood leukocytes. *Clinical biochemistry* [online]. 2007, **40**(13-14): 1037-1044 [cit. 2021-5-06]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912007001828>. ISSN 0009-9120.
- [39] WAINWRIGHT, Patricia E. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proceedings of the Nutrition*

- Society* [online]. 2002, **61**(1), 61-69 [cit. 2021-5-07]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12002796/>. ISSN 0029-6651.
- [40] MELHEM, Elias R., Daniel J. LOES, Christos S. GEORGIADES et al. X-linked adrenoleukodystrophy: The role of contrast-enhanced MR imaging in predicting disease progression. *American journal of neuroradiology* [online]. 2000, **21**(5): 839-844 [cit. 2021-5-07]. Dostupné z: <http://www.ajnr.org/content/21/5/839.short>
- [41] SCHNEIDER, Jacques F. L., Kamil A. II'YASOV, Eugen BOLTSHAUSER et al. Diffusion tensor imaging in cases of adrenoleukodystrophy: preliminary experience as a marker for early demyelination?. *American journal of neuroradiology* [online]. 2003, **24**(5): 819-824 [cit. 2021-5-08]. Dostupné z: <http://www.ajnr.org/content/24/5/819.short>. ISSN 1936-959X.
- [42] EICHLER, Florian, Asif MAHMOOD, Daniel LOES et al. Magnetic resonance imaging detection of lesion progression in adult patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Archives of neurology* [online]. 2007, **64**(5): 659-664 [cit. 2021-5-08]. Dostupné z: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/793852>. ISSN 0003-9942.
- [43] VAN GEEL, B. M, J. ASSIES, R. J A WANDERS a P. G BARTH. X linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. 1997, **63**(1), 4-14 [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: doi:10.1136/jnmp.63.1.4. ISSN 0022-3050.
- [44] AL-DIRBASHI, Osama Y., Tomofumi SANTA, Mohamed S. RASHED et al. Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic, and very long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders. *Journal of lipid research* [online]. 2008, **49**(8): 1855-1862 [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18441019/>. ISSN 0022-2275.
- [45] MOSER, Hugo W., Ann B. MOSER, Karen K. FRAYER et al. Adrenoleukodystrophy: Increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology* [online]. 1981, **31**(10): 1241-1249 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: <http://www.neurology.org/content/31/10/1241.short>. ISSN 0028-3878.

- [46] HUBBARD, Walter C., Ann B. MOSER, Silvia TORTORELLI et al. Combined liquid chromatography–Tandem mass spektrometry as an analytical method for high throughput screening for X-linked adrenoleukodystrophy and other peroxisomal disorders: Preliminary Wndings. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2006, **89**(1-2): 185-187 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.05.001>. ISSN 1096-7192.
- [47] LAN, Fenghua, Zhihong WANG, Haihua XIE et al. Molecular diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy: Experience from a clinical genetic laboratory in mainland China with report of 13 novel mutations. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2011, **412**(11-12), 970-974 [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.01.036>. ISSN 00098981.
- [48] FERNANDES, John. *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. 1. vyd. Praha: Triton, 2008, 607 s. ISBN 978-80-7387-096-6.
- [49] ŠŤASTNÁ, Sylvie. Laboratorní diagnostika dědičných metabolických poruch. *Medicína pro praxi* [online]. 2008, **5**(6): 274-276 [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-200806-0010_Laboratorni_diagnostika_dedicnych_metabolickyh_poruch.php.
- [50] LAN, Fenghua, Zhihong WANG, Longfeng KE, et al. A rapid and sensitive protocol for prenatal molecular diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2010, **411**(23-24), 1992-1997 [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20800589/>. ISSN 00098981.
- [51] VOGEL, B.H., S.E. BRADLEY, D.J. ADAMS, et al. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy in New York State: Diagnostic protocol, surveillance protocol and treatment guidelines. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2015, **114**(4), 599-603 [cit. 2021-5-16]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25724074/>. ISSN 10967192.
- [52] HUBBARD, Walter C., Ann B. MOSER, Anita C. LIU, et al. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): Validation of a combined liquid chromatography–tandem mass spectrometric (LC–MS/MS) method. *Molecular*

- Genetics and Metabolism* [online]. 2009, **97**(3), 212-220 [cit. 2021-5-16]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.03.010>. ISSN 10967192.
- [53] VARGAS, Carmen R., Alethéa G. BARSCHAK, Daniella M. COELHO, et al. Clinical and biochemical findings in 7 patients with X-linked adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's Oil. *Genetics and Molecular Biology* [online]. 2000, **23**(4), 697-701 [cit. 2021-5-18]. Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/zZdkFyB3nXyN6ZQwcrzdNQf/abstract/?lang=en>. ISSN 1415-4757.
- [54] EICHLER, Florian a Patrick AUBOURG. Therapeutics of X-linked adrenoleukodystrophy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* [online]. 2008, **5**(4), 237-242 [cit. 2021-5-18]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1740677309000126>. ISSN 17406773.
- [55] PRIETO TENREIRO, Alma, María Ángeles PENACHO LÁZARO, Rosario ANDRÉS CELDA et al. Dietary treatment for X-linked adrenoleukodystrophy: Is “Lorenzo's oil” useful? *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* [online]. 2013, **60**(1), 37-39 [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2173509313000020>. ISSN 21735093.
- [56] RAYMOND, Gerald V. Adrenoleukodystrophy (ALD) and Lorenzo’s Oil: An Update. *Nutricia Metabolics Inspiring Futures* [online]. 2015 [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: https://www.nutricialearningcenter.com/globalassets/pdfs/metabolics/ald-webinar-g-raymond-handouts_dec-2015.pdf?epieditmode=False.
- [57] SUZUKI, Y., K. ISOGAI, T. TERAMOTO, et al. Bone marrow transplantation for the treatment of X-linked adrenoleukodystrophy. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2000, **23**(5), 453-458 [cit. 2021-5-21]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005656029200>. ISSN 01418955.
- [58] MOSER, Hugo W. Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *NeuroRX* [online]. 2006, **3**(2), 246-253 [cit. 2021-5-21]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1016/j.nurx.2006.01.004>. ISSN 1545-5343.

- [59] ENGELLEN, Marc, Rob OFMAN, Marcel G.W. DIJKGRAAF, et al. Lovastatin in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *New England Journal of Medicine* [online]. 2010, **362**(3), 276-277 [cit. 2021-5-21]. Dostupné z: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc0907735>. ISSN 0028-4793.
- [60] RICHTER, Václav a Milan KRAITR. Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie. *Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni* [online]. 2004 [cit. 2021-5-24]. Dostupné z: https://old.fpe.zcu.cz/export/sites/fpe/kch/dokumenty/Priloha_III.pdf.
- [61] COUFAL, Pavel. Planární (plošná) chromatografie. *Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy* [online]. 1996 [cit. 2021-5-24]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>.
- [62] GUPTA, Vinod Kumar, Hadi KHANI, Behzad AHMADI-ROUDI et al. Prediction of capillary gas chromatographic retention times of fatty acid methyl esters in human blood using MLR, PLS and back-propagation artificial neural networks. *Talanta* [online]. 2011, **83**(3), 1014-1022 [cit. 2021-5-24]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.017>. ISSN 00399140.
- [63] VÁVROVÁ, Jaroslava. Chromatografické metody. *Datový standard MZ ČR* [online]. 2006 [cit. 2021-5-24]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJAOF.htm>.
- [64] Derivatizace v HPLC. VŠCHT PRAHA [online]. [cit. 2021-5-24]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/7%202019%20HPLC%20Derivatizace.pdf>
- [65] SHERMA, Joseph a Bernard FRIED. *Handbook of thin-layer chromatography*. 3. vyd. New York: Marcel Dekker, 2003, 1331 s. ISBN 0-8247-0895-4.
- [66] Kvalitativní analýza – Tenkovrstvá chromatografie (TLC). *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. 2018 [cit. 2021-5-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2018/C7640/um/18_IA_tenkovrstva__chromatografie__TLC__navod.pdf

- [67] PERTILE, Eva, Vladimír ČÁBLÍK a Institut enviromentálního inženýrství. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2006, 34 s. ISBN 80-248-1049-2.
- [68] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [69] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-227-8.
- [70] JANČÁŘOVÁ, Irena, Luděk JANČÁŘ a Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-647-6.
- [71] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [72] Leriglitazone. *Minoryx therapeutics* [online]. 2021, [cit. 2021-5-28]. Dostupné z: <https://www.minoryx.com/leriglitazone/>.
- [73] RODRÍGUEZ-PASCAU, Laura, Elena BRITTI, Pablo CALAP-QUINTANA, et al. PPAR gamma agonist leriglitazone improves frataxin-loss impairments in cellular and animal models of Friedreich Ataxia. *Neurobiology of Disease* [online]. 2021, **148** [cit. 2021-5-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105162>. ISSN 09699961.
- [74] KAUR, Narinder, Vishal CHUGH a Anil K. GUPTA. Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2014, **51**(10), 2289-2303 [cit. 2021-6-01]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13197-012-0677-0>. ISSN 0022-1155.
- [75] HAAG, Marianne. Essential Fatty Acids and the Brain. *The Canadian Journal of Psychiatry* [online]. 2003, **48**(3), 195-203 [cit. 2021-6-01]. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/070674370304800308>. ISSN 0706-7437.
- [76] HOFMANOVÁ, Jiřina. Úloha lipidů v rozvoji nádorových onemocnění. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. 2012-2013 [cit.

2021-6-01].

Dostupné

z:

https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/15_lipidy.html

- [77] KEMP, Stephan, Fredoen VALIANPOUR, Simone DENIS et al. Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2005, **84**(2), 144-151 [cit. 2021-6-05]. ISSN 10967192. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.09.015>
- [78] TOŠOVSKÁ, Aneta. *Poruchy metabolismu mastných kyselin u adrenoleukodystrofie*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce prof. Ing. Alexandr Čegan, CSc.

7. CITACE OBRÁZKŮ A TABULEK

- [1] Metabolismus lipidů. *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. 2016 [cit. 2021-3-05]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLKBC0211p/um/Synteza_a_odbourani_mastnych_kyselin2016.pdf.
- [2] SCHRADER, Michael, Joseph COSTELLO, Luis F. GODINHO a Markus ISLINGER. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2015, **38**(4), 681-702 [cit. 2021-3-08]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-peroxisomal-and-mitochondrial-fatty-acid-b-oxidation-pathways-As_fig1_272519391. ISSN 0141-8955.
- [3] Facts on ALD. *ALD info* [online]. 2021 [cit. 2021-4-05]. Dostupné z: <https://adrenoleukodystrophy.info/clinical-diagnosis/facts-on-ald>.
- [4] EICHLER, Florian, Asif MAHMOOD, Daniel LOES et al. Magnetic resonance imaging detection of lesion progression in adult patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Archives of neurology* [online]. 2007, **64**(5): 659-664 [cit. 2021-5-08]. Dostupné z: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/793852>. ISSN 0003-9942.
- [5] RATTAY, Tim W., Maren RAUTENBERG, Anne S. SÖHN et al. Defining diagnostic cutoffs in neurological patients for serum very long chain fatty acids (VLCFA) in genetically confirmed X-Adrenoleukodystrophy. *Scientific Report* [online]. 2020, **10**: 15093 [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71248-8>.
- [6] DOSTÁLOVÁ, Jana. Tuky v potravinách a jejich nutriční hodnocení. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2011, **13**(9): 347–349 [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-201109-0008_Tuky_v_potravinach_a_jejich_nutricni_hodnoceni.php.
- [8] NIKOLOVA, Irina. Chromatografické metody. *Český hydrometeorologický ústav* [online]. 2014 [cit. 2021-5-26]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf.

- [9] PERTILE, Eva, Vladimír ČÁBLÍK a Institut enviromentálního inženýrství. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [10] RUSSO, Gian Luigi. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2009, 77(6), 937-946 [cit. 2021-6-14]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19022225/>. ISSN 00062952.