Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Chromatografická analýza ušního mazu

Diplomová práce

2022 Bc. Renata Nováková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Renata Nováková**
Osobní číslo:	**C20478**
Studijní program:	**N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce:	**Chromatografická analýza ušního mazu**
Téma práce anglicky:	**Chromatographic Analysis Of Earwax**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte rešerši a prostudujte literární údaje o kvalitativním složení lipidů ušního mazu a o metodikách jejich kvantitativního stanovení.
2. Vybranou analytickou metodou stanovte hladiny lipidů ušního mazu, stanovte experimentální referenční hodnoty u vzorku populace.
3. Výsledky zpracujte pomocí statistických metod a stanovené hodnoty diskutujte ve vztahu ke zvoleným sledovaným faktorům.
4. Stanovené hodnoty a výsledky statistického zpracování kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Ing. Martina Špryncová**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Práci s názvem Chromatografická analýza ušního mazu jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 05.06.2022

Bc. Renata Nováková, v. r.

Poděkování

Děkuji prof. Ing. Alexanderu Čeganovi, CSc. a Ing. Bc. Martině Špryncové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Především bych chtěla poděkovat paní doktorce za její vstřícnost a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři a konzultacích, dále za poskytnuté rady, trpělivost a pomoc.

Dále bych chtěla poděkovat lékařům a sestrám, kteří mi poskytli vzorky ušních špuntů pro mou následnou analýzu v laboratoři – MUDr. Ivo Zbořil, MUDr. Klára Praislerová, MUDr. Zdara Pezinková (všichni tři Pardubice), MUDr. Iva Faltová a zaměstnanci ORL ambulance PRO-Sluch (oba Hradec Králové) a MUDr. Miloslav Černý (Chrudim).

Dále bych chtěla poděkovat rodině za trpělivost a podporu.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá analýzou mastných kyselin v ušním mazu. Ke stanovení byla použita metoda tenkovrstvé chromatografie, kde se jednotlivé frakce rozdělily. Závěrečné měření jednotlivých frakcí probíhalo na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ušní maz, chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie

TITLE

Chromatographic analysis of earwax

ANNOTATION

The diploma thesis deals with the analysis of fatty acids in earwax. The method of thin-layer chromatography was used for determination, where the individual fractions were separated. The final measurement of individual fractions was performed on a gas chromatograph with a flame ionization detector.

KEYWORDS

Earwax, chromatography, thin layer chromatography, gas chromatography

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK 9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK 10
ÚVOD 12
1 TEORETICKÁ ČÁST 13
1.1 Sluchové ústrojí 13
1.1.1 Ušní maz 15
1.2 Lipidy 17
1.2.1 Význam lipidů 18
1.2.2 Lipidy v ušním mazu 19
1.2.2.1 Fosfolipidy 19
1.2.2.2 Mastné kyseliny 20
1.2.2.2.1 Biosyntéza mastných kyselin 21
1.2.2.2.2 Odbourávání mastných kyselin 22
1.2.2.3 Triacylglyceroly 23
1.2.2.4 Cholesterol 24
1.2.2.4.1 Skvalen 26
1.3 Chromatografie 26
1.3.1 Princip a dělení chromatografie 26
1.3.2 Historie 28
1.3.3 Chromatografie na tenké vrstvě 31
1.3.3.1 Hodnocení 33
1.3.4 Plynová chromatografie 34
1.3.4.1 Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem 35
1.3.4.2 Plynová chromatografie s plameno-ionizačním detektorem 36
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 38
2.1 Seznam chemikálií a pomůcek 38

2.2 Postup 40
3 VÝSLEDKY A DISKUSE 46
4 ZÁVĚR 72
5 POUŽITÁ LITERATURA 73
6 SEZNAM PŘÍLOH 78

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Anatomie lidského ucha (Votava, 2015) 13
Obrázek 2 – Rozdělení lipidů (Břížďala, 2020) 18
Obrázek 3 – Prodlužování mastných kyselin u savců (Zeman, 2019) 21
Obrázek 4 – Čtyři kroky u beta-oxidace mastných kyselin (Fillmore, 2021) 23
Obrázek 5 – Syntéza cholesterolu (Palmer, 2014). 25
Obrázek 6 – Plynová chromatografie – schéma (McNair, 2021) 34
Obrázek 7 – Chromatografická deska 41

Tabulka 1 – Rozdělení separačních metod (Nikolova, 2014, Vávrová, 2004).....27
Tabulka 2 – Stacionární fáze a způsob separace (Rogers, 2019) 32
Tabulka 3 – Přehled analyzovaných vzorků ušního mazu 46
Tabulka 4 – Přesnost metody pro frakce PL, DG.....47
Tabulka 5 – Přesnost metody pro frakce FFA, TAG, EC 48
Tabulka 6 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu ve frakci PL.....49
Tabulka 7 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u frakce PL.....51
Tabulka 8 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech PL pokračování....52
Tabulka 9 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu ve frakci DG.....53
Tabulka 10 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u frakce DG.....55
Tabulka 11 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech DG pokračování.56
Tabulka 12 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu ve frakci FFA 57
Tabulka 13 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u frakce FFA 59
Tabulka 14 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech FFA pokračování 60
Tabulka 15 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu ve frakci TAG 61
Tabulka 16 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u frakce TAG 63
Tabulka 17 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech TAG pokračování 64
Tabulka 18 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu ve frakci EC 65
Tabulka 19 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u frakce EC 67
Tabulka 20 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech EC pokračování .68
Tabulka 21 – Průměrná koncentrace 40-ti mastných kyselin pro frakce a věkové skupiny ...69
Tabulka 22 – Průměrná koncentrace mastných kyselin pro frakce, věkové skupiny a pohlaví 70

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
CV	variační koeficient
ČR	Česká republika
DG	diacylglyceroly
EC	estery cholesterolu
ELOVL	elongace (prodlužování mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem)
FAD	flavinadenindinukleotid
$FADH_2$	flavinadenindinukleotid (redukovaná forma)
FFA	volné mastné kyseliny (z angl. free fatty acid)
FID	plamenový ionizační detektor (z angl. flame ionization detector)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GPC	gelová permeační chromatografie
GSC	plynová adsorpční chromatografie
HACD	3-hydroxyacyl-CoA dehydratáza
HMG-CoA	*β*-hydroxy-*β*-methylglutaryl-CoA
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
Hz	hertz
IEC	iontově výměnná chromatografie
IC	iontová chromatografie
KAR	3-ketoacyl-CoA reduktáza
LC	kapalinová chromatografie
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie

MCFA	mastné kyseliny se středním řetězcem
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní detektor
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaná forma)
PC	papírová chromatografie
PL	fosfolipidy
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SFC	superkritická fluidní chromatografie
MS	hmotnostní detektor
STD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
TAG	triacylglyceroly
TER	*trans*-2-enoyl-CoA reduktáza
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)
TOF	detektor doby letu
UV	ultrafialové záření
VLCFA	mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (z angl. very long chain fatty acids)
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (z angl.very low density lipoproteins)

ÚVOD

Diplomová práce se zabývá analýzou mastných kyselin v ušním mazu. Ušní maz (latinsky *cerumen*) je přirozenou produkcí sluchového orgánu a má zpravidla ochrannou funkci proti vstupu infekce. Může však docházet k problémům vedení zvuku, což je často způsobeno nahromaděním ušního mazu před bubínkem.

Ušní maz má řadu fenotypů. I podle typu *cerumenu* lze odlišit etnickou rasu a určit prostředí, ve kterém člověk žije. V posledních letech se začíná ušní maz využívat v řadě analýz. Stanovuje se u něj hladina lipidů, proteinů a různých chemických látek, které přecházejí do ušního mazu z krevního oběhu. V současné době se začíná *cerumen* používat k identifikaci biomarkerů rakoviny. Cílem by měla být vyšší přesnost diagnostiky rakoviny, avšak tyto analýzy jsou teprve v počátcích. *Cerumen* byl úspěšně použit k diagnostice *diabetes mellitus* a k odlišení typu I a II.

Cílem diplomové práce bylo prozkoumat hladiny mastných kyselin u různých věkových skupin populace.

Práce je rozdělena do dvou hlavních částí. První je teoretická, kde je popsáno sluchové ústrojí a ušní maz. Dále je zde kapitola lipidů, které lze nalézt v ušním mazu a v závěru teoretické části je chromatografie, protože konečná analýza probíhala metodou plynové chromatografie.

Druhá část je věnována analýze vzorků ušního mazu u skupiny populace. Vzorky byly rozděleny do 4 skupin. První 0 – 30 let, druhá 31 – 60 let, třetí 61 – 70 let a čtvrtá lidé starší 71 let. Ve skupině byly hodnoceny dohromady muži a ženy.

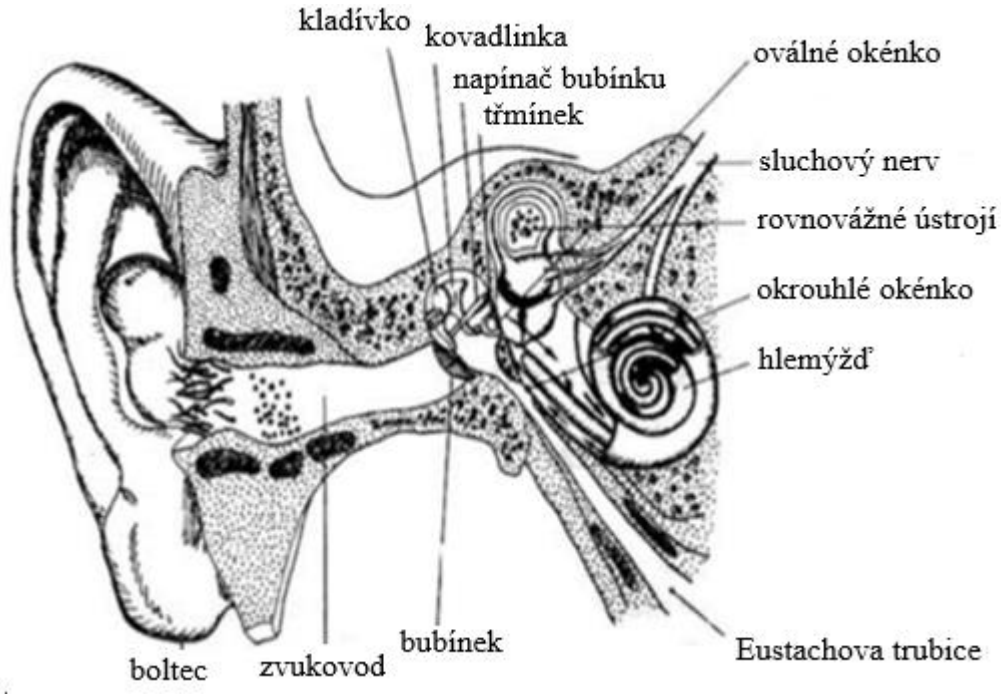
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Sluchové ústrojí

Ucho je sluchový orgán s nejvyšší citlivostí ze všech smyslů, kterým přijímáme mechanické vlnění v rozsahu 16 – 20 000 Hz. Hranice slyšitelnosti je relativní a s rostoucím věkem se výrazně snižuje. Sluchové ústrojí je uloženo spolu s receptory pro vnímání polohy a pohybu člověka ve vnitřním uchu. Nesporný význam sluchu spočívá v přijímání informací z vnějšího prostředí. Sluch člověka výrazně zaostává za citlivostí sluchu mnoha živočichů, avšak pro člověka má významný smysl. Je důležitou součástí mezilidské komunikace a sociální interakce. Lidské řeči odpovídá rozmezí 1000 – 5000 Hz, což je nejcitlivější oblast vnímání zvuků (Mourek, 2012; Orel, 2019).

„Sluch pokrývá dvě ze tří složek přímé mezilidské komunikace – verbální (slovní) a paraverbální (doprovázející slovo, zahrnující mimo jiné tón a výšku hlasu, intonaci, rychlost řeči, vydávané zvuky). Neverbální složka komunikace (označována jako řeč těla, do které spadají gesta, mimika, pohyby, vzdálenosti a další) je registrována zejména prostřednictvím zraku (s možným podílem hmatu a čichu).“ (Orel, 2019 str. 379).

Sluchový orgán lze rozlišit dle anatomického a fyziologického hlediska na tři části: zevní, střední a vnitřní ucho (viz Obrázek 1).



Obrázek 1 – Anatomie lidského ucha. Upraveno podle: (Votava, 2015).

Zevní ucho (*auris externa*) je dobře patrnou součástí ušního ústrojí. Skládá se z ušního boltce a zevního zvukovodu, který je zakončen bubínkem. Hlavní úlohou je zachytit, koncentrovat a přenést zvuk, který vzniká chvěním pevných těles do středního ucha.

Ušní boltec (*auricula*) má u člověka stejně jako u dalších tvorů druhově specifický tvar s určitou mírou variability. Poloha i tvar ušního boltce ovlivňuje přesné směrové slyšení zvláště u zvířat, kteří dokážou stáčet boltec ve směru přicházejícího zvuku. Člověk má ušní boltec přivrácen k hlavě v úhlu 20 – 40°. Základem ušního boltce je elastická chrupavka, která je kryta tenkou vrstvou kůže. Nejvýraznějším útvarem na uchu je vnější kožní závit boltce (*helix*), kde na jeho kraniálním okraji lze nalézt Darwiniho hrbolek (*tuberculum auriculae Darwin*). Horní okraj boltce leží na úrovni kořene nosu, dolní část vybíhá v různě dlouhý ušní lalůček (*lobulus auriculae*), který je tvořený pouze kůží.

Zevní zvukovod (*meatus acusticus externus*) má u člověka podobu nálevkovitě se zužující, lehce zalomené trubice vycházející z ušního boltce, a slepě zakončenou bubínkem. Zevní zvukovod je dlouhý přibližně 2,5 cm s průměrem 6 – 8 mm. Části zvukovodu se liší ve svém podkladu – vnější zevní část zvukovodu má chrupavčitý podklad, zatímco vnitřní část má kostěný podklad. Zevní zvukovod je vystlán po celé své délce kůží, která je v chrupavčitém úseku silná a v kostěném velmi tenká. V kůži se nachází drobné mazové žlázky produkující ušní maz (*cerumen*).

Bubínek (*membrána tympani*) zakončuje zevní zvukovod. Má tvar nálevkovitě vpáčené perleťově lesklé vazivové blanky oválného tvaru. Jde o rozhraní zevního a středního ucha, protože vnitřní strana bubínku srůstá s kladívkem, což je část první středoušní kůstky. Bubínek kmitá stejnou frekvencí, s jakou přichází zvukový stimulus a tuto frekvenci stimulu předává dále prostřednictvím kladívka. (Dylevský, 2009; Mourek, 2012; Muknšnáblová, 2014; Orel, 2019)

Střední ucho (*auris media*) se nachází uvnitř kosti spánkové. Hlavní část středního ucha je středoušní dutina (*cavum tympani*), která je oddělena od zevního zvukovodu bubínkem. Jde o úzký prostor krychlového tvaru uvnitř kosti spánkové. Kontakt s vnitřním uchem zajišťují dvě malá okénka vyplněná membránou – oválné okénko vestibulární (*fenestra ovalis*) a okrouhlé okénko kochleární (*fenestra rotunda*). Středoušní dutina je tvořena třemi nejmenšími kůstkami lidského těla (*malleus, incus, stapes*) a dvěma středoušními svaly. Prostor středního ucha je Eustachovou trubicí propojen s nosohltanem, což zajistí vyrovnávání tlaku

ve vnitřním uchu s atmosférickým tlakem a nedochází k porušení bubínku. (Mourek, 2012; Musiek, 2020; Orel, 2019)

Kladívko (*malleus*) je drobná kůstka přecházející v protáhlou rukojeť s kulovitou hlavičkou, která je kloubem spojena s kovadlinou. Kovadlina (*incus*) je střední částí tří kůstek. Kovadlina má dlouhý výběžek, který je zakončen drobnou kloubní ploškou pro připojení třmínku. Třmínek (*stapes*) dostal svůj název podle jezdeckého třmenu, kterému se tvarově podobá. Báze třmínku přirůstá k membráně okénka v mediální stěně střední dutiny. *M. tensor tympani* má začátek u chrupavky Eustachovy trubice a tenkou šlachou se upíná na rukojeť kladívka. Druhý sval *m. stapedius* začíná na kostěné vyvýšenině zadní stěny středoušní dutiny a upíná se do místa spojení obou ramének třmínku. (Dylevský, 2009; Orel, 2019)

Vnitřní ucho (*auris interna*) leží v kostěném labyrintu spánkové kosti. Kostnatá struktura je zcela uzavřená a připomíná skořápku šneka a má 2,5 otáčky. Dále má dva otvory pokryté membránami, které jsou propojeny s dutinou středního ucha. Hlemýžď (*cochlea*) je spirálně stočená trubice 35 mm dlouhá. Ve středním patře blanitého hlemýždě je uložen sluchový receptor – Cortiho orgán. Cortiho orgán je složen ze tří typů buněk – vnější a vnitřní vláskové buňky a podpůrné buňky. (Musiek, 2020; Orel, 2019)

1.1.1 Ušní maz

Ušní maz má ochrannou funkci proti vstupu infekce. Podle Hansena má maz žlutou až nahnědlou barvu, a především je tvořen tukem, který zajišťuje lepkavý a lesklý vzhled. Ušní maz vzniká při fyziologických pochodech v kůži zevního zvukovodu, kde po smíchání produktů mazových žlázek (*glandulae ceruminosae*) s oloupanými epiteliálními buňkami, chloupky z kožní výstelky a malými nečistotami z vnějšího prostředí (pyl, prach) vzniká *cerumen*, který je posouván k ústí zvukovodu, kde volně vypadává. Množství *cerumenu* je různé mezi jednotlivci i u jednoho člověka v průběhu časového období. Nástěnný *cerumen* není nutné odstraňovat, avšak pravidelné čištění ušního mazu je doporučeno u pacientů po ušních operacích, nebo uživatelům sluchátek. Nahromadění ušního mazu před bubínkem má nepříznivý vliv na vedení zvuku. Nejčastěji postihuje starší jedince, u kterých se porucha šíření zvuku projevuje nedoslýchavostí. (Hansen, 2020; Konštacký, 2020; Muknšnáblová, 2014; Pokorný, 2009)

Fenotyp ušního mazu je určen v genu ABCC11 dvěma alelami (C – dominantní a T – recesivní) a je často spojován i s etnickou rasou. Suchý, bílý typ (alela T) převládá u východoasiatů (až 95 %), jen vzácně ho lze nalézt u Afričanů a Evropanů (3 %). Smíšený typ ušního mazu se nalézá u obyvatel severoamerických oblastí, tichomořských ostrovů a dále např. ve střední Asii a Turecku. (Prokop-Prigge, 2015; Shokry, 2017)

Podle Overfieldové lze u lidí odlišit mokrý a suchý ušní maz. Přibližně 85 % orientálců a amerických indiánů má suchý ušní maz. V černošské a bělošské populaci je výskyt suchého ušního mazu mnohem nižší. U této populace převažuje alela mokrého mazu (C) – 97 % pro bělochy a 99 % pro černochy.

Mazový polymorfismus zahrnuje náchylnost k podnebím a chorobám. Bylo zjištěno, že ušní maz reaguje nejen na teplotu, ale i na vlhkost, proto je mokrý maz běžný v horkém a čistém prostředí. Ušní maz může korelovat i s citlivostí na různé nemoci. U žen se suchým ušním mazem je nižší výskyt rakoviny prsu než žen s mokrým ušním mazem. Spojení rakoviny a ušního mazu může být způsobeno působením pleiotripické alely, která ovlivňuje apokrinní systém. Dále byla nalezena i souvislost mezi množstvím sekrece prsu a typem ušního mazu – ženy s mokrým ušním mazem mají vyšší hladiny sekrece prsu než ženy se suchým ušním mazem.

Ještě byla nalezena souvislost mezi typem ušního mazu a podpažní vůní. Ze studie japonských Malajců, asijských indiánů a Číňanů vyplývá silná souvislost tělesného pachu s mokrým ušním voskem. U více jak 90 % jedinců, kteří měli suchý ušní maz nebyl znatelný tělesný zápach, zatímco u 60 % lidí s mokrým ušním mazem byl tělesný zápach patrný. Změny v typu mazu může vyvolat i modifikace genu, či zapojení dalších alel.

Černoši a běloši mají silnější tělesný zápach než původní Američani, kteří mají suchý ušní maz. Složení suchého a mokrého ušního mazu se liší. U mokrého mazu převažují lipidy – 50 % lipidů a 20 % bílkovin, u suchého mazu převažují bílkoviny – 43 % bílkovin, 18 % lipidů. Axiální zápach pravděpodobně souvisí s rozkladem lipidů, který převažuje u černošské a bělošské populace.

Suchý ušní maz je šedý a mokrý ušní maz je hnědý. Suchý maz je šupinatý a Japonci ho nazývají jako „ušní maz z rýžových otrub“. Mokrý ušní maz lze označit i jako medový ušní maz. (Overfield, 2017)

Ušní maz byl v posledních desetiletích velmi málo využívaným klinickým materiálem. V dnešní době se odhalil jeho význam a je hojně využívaný v diagnostických biomarkerech. Používá se jako genetický materiál, lze ho využít i jako materiál pro stanovení hladin lipidů, proteinů, chemických prvků, organických sloučenin, aminokyselin i xenobiotik. Tyto látky přechází do ušního mazu z krevního oběhu. Ušní maz je schopen odrážet nejen patologii a fyziologii lidského těla, ale lze v něm detekovat dlouhodobé nebo nedávné vystavení látkám znečišťující životní prostředí. (Shokry, 2017)

Při využití ušního mazu k diagnostickým účelům se musí pracovat obezřetně. V některých odvětvích je ušní maz na počátku diagnostických postupů např. u identifikace těkavých biomarkerů rakoviny (cerumenogram). Cílem vyšetření je zvýšit přesnost diagnostiky rakoviny a tím i zlepšit šanci na úspěšnou léčbu. *Cerumen* byl úspěšně použit i k diagnostice *diabetes mellitus* a k odlišení *diabetes mellitus* I. a II. typu. (Barbosa, 2019; Shokry, 2017)

1.2 Lipidy

Lipidy jsou sloučeniny, které nemají přesně definovanou strukturu. Jde o heterogenní, pestrou skupinu látek, které nejsou rozpustné ve vodě (jsou hydrofobní), ale jsou dobře rozpuštěné v organických rozpouštědlech. Mezi nepolární rozpouštědla řadíme například benzen, methanol, aceton, sirouhlík, diethylether, chloroform nebo horký ethanol. Vlastnost lipidů se rozpouštět v nepolárních rozpouštědlech se používá k extrakci lipidů ze směsí pomocí vhodných rozpouštědel. Špatná rozpustnost lipidů ve vodě je způsobena nižším obsahem polarizujících atomů N, O, S a P. (Břížďala, 2020; Кольман, 2019; Žáková, 2019)

Lipidy lze zařadit do skupiny nízkomolekulárních látek, protože jejich hodnoty relativních molekulových hmotností jsou nižší než 1500.

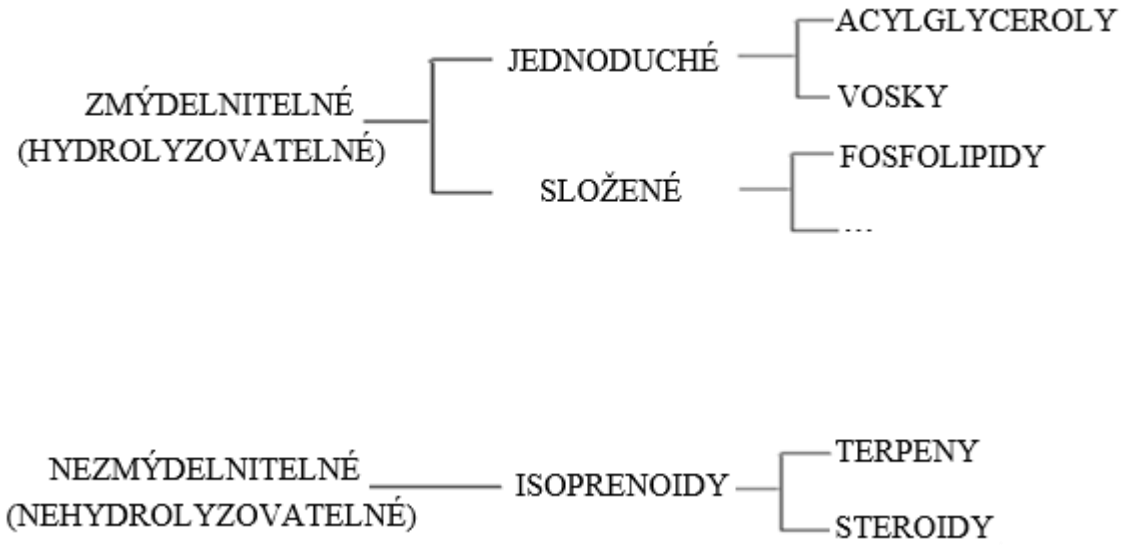
Společným znakem lipidů je velká převaha nepolárních uhlovodíkových struktur v molekule, díky nimž mají lipidy voskovou a olejovou povahu.

Lipidy lze rozdělit (viz Obrázek 2) na zmýdelnitelné (hydrolyzovatelné) lipidy, mezi které nejčastěji zařazujeme estery mastných kyselin a alkoholů. Reakcí zmýdelnitelných lipidů se zásaditými vodnými roztoky vznikají soli vyšších mastných kyselin. Tyto soli se využívají jako mýdla. Hydrolyzované lipidy mohou podlehnout hydrolytickému štěpení. Druhá skupina

jsou nezmýdelnitelné (nehydrolyzovatelné) lipidy, kam patří isopententenyl, isoprenoidy. Reakcí těchto lipidů se zásaditými vodnými roztoky nevznikají soli využívané jako mýdla.

Zmýdelnitelné lipidy lze dále rozdělit na jednoduché a složené

- Jednoduché – acylglyceroly a vosky
- Složené – fosfoacylglyceroly a sfingolipidy, glykolipidy a lipoproteiny (Břížďala, 2020; Кольман, 2019).



Obrázek 2 – Rozdělení lipidů. Upraveno podle: (Břížďala, 2020).

1.2.1 Význam lipidů

Ve stravě jsou lipidy hlavním zdrojem energie. Jde o nejdůležitější zásobárnu energie v těle živočichů. Lipidové kapénky, které jsou složeny z neutrálních tuků jsou uloženy ve specializovaných buňkách adipocytech. Podle potřeby mohou adipocyty poskytovat mastné kyseliny, které se transportují do tkání a v nich se za přítomnosti kyslíku oxidují na oxid uhličitý a vodu. Při oxidaci se tvoří redukované koenzymy, které se využívají v dýchacím řetězci za vzniku ATP.

V porovnání se sacharidy je množství lipidů v těle vyšší, ale jejich energetická pohotovost je nižší. Tuková tkáň poskytuje dlouhodobou rezervu uvolňování energie. Oxidací lipidů organismus získá 38 kJ/g, oxidací sacharidů získá pouze 17 kJ/g. Lipidy se spojují

s bílkovinami a vytváří lipoproteiny, které jsou součástí buněčných membrán, cytoplazmy či mitochondrií. Mezi hlavní membránové lipidy patří fosfolipidy.

Lipidy mají výborné izolační vlastnosti. U vyšších živočichů najdeme acylglyceroly v podkožním vazivu a také kolem některých orgánů, kde slouží jako tepelné izolátory a chrání příslušné orgány před mechanickým poškozením. Lipidy patří mezi látky, které špatně vedou teplo a díky této vlastnosti chrání organismus před tepelnými ztrátami. V podkoží fungují jako izolační bariéra, kdy zabraňují nejen nadměrné ztrátě tepla, ale i vody. Organismus může při hladovění odčerpat až 90 % tukových zásob, což je 10 – 15 % hmotnosti průměrného člověka. (Dylevský, 2019; Кольман, 2019; Žáková, 2019)

1.2.2 Lipidy v ušním mazu

Detailní studie lipidových frakcí ušního mazu opakovaně identifikovaly přítomnost skvalenu, triacylglycerolů, nasycených i nenasycených volných mastných kyselin, cholesterolu a esterů cholesterolu a dalších látek (Pokorný, 2007).

1.2.2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy patří mezi polární lipidy a patří spolu s cholesterolem mezi hlavní složku buněčných membrán. Fosfolipid se skládá ze dvou mastných kyselin, molekuly glycerolu a fosfátové skupiny. Obecně se fosfolipid skládá z hydrofilní hlavy (fosfátová skupina) a hydrofobního ocasu (konec mastné kyseliny). Fosfolipid lze označit jako triglycerid, ve kterém je mastná kyselina nahrazena fosfátovou skupinou. (Bailey, 2020; Soult, 2020) Mastné kyseliny jsou navázány na C1 a C2, na C3 je navázána fosfátová skupina, na kterou je napojena funkční skupina, kterou může být serin, cholin, inozitol nebo ethanol. Podle funkční skupiny jsou fosfolipidy pojmenovány. (Sharma, 2018)

Ve vodě tvoří fosfolipidy dvojitou vrstvu zvanou lipidová dvojvrstva, kde jsou hydrofilní hlavy a hydrofobní ocasy interagují pouze mezi sebou. Lipidová dvojvrstva působí jako bariéra pro průchod molekul a iontů do buňky a z buňky. Zabudováním různých proteinových molekul do a skrz lipidovou dvojvrstvu je umožněn selektivní průchod určitých látek. Zabudované proteiny tvoří kanály, kterými se pohybují molekuly a specifické ionty. Mnoho membránových

proteinů obsahuje připojené sacharidy na vnější straně lipidové dvojvrstvy, což umožňuje vytvářet vodíkové vazby s vodou. (Bailey, 2020; Soult, 2020)

1.2.2.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhými nenasycenými a nasycenými alifatickými řetězci. Většina přírodních mastných kyselin se skládá z nerozvětvených uhlíků se sudým počtem uhlíků (4 – 28). Nasycené mastné kyseliny nemají žádnou dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku, na rozdíl od nenasycených mastných kyselin, které mají jednu nebo i více dvojných vazeb mezi uhlíky. Díky existenci dvojných vazeb u nenasycených mastných kyselin lze rozlišit izomery typu *cis* a *trans*, přičemž izomery typu *cis* jsou dominantně se vyskytující u nenasycených mastných kyselin a *trans* izomery jsou vyráběny pomocí umělé syntézy. (Kimura, 2019) Dále lze mastné kyseliny rozdělit na esenciální a neesenciální. Mezi esenciální mastné kyseliny řadíme kyseliny, které si člověk neumí nasyntetizovat v těle a musí být přijímány potravou. Lidské tělo umí desaturovat mastné kyseliny do 9. uhlíku. Mezi esenciální mastné kyseliny patří kyselina arachidonová (C20:4, ω-6), linolová (C18:2, ω-6) a linolenová (C18:3, ω-3). Kyseliny linolová a linolenová se mohou přeměnit na kyselinu arachidonovou a tím ji lze případně nahradit, protože kyselina arachidonová se používá k syntéze eikosanoidů. (Кольман, 2019).

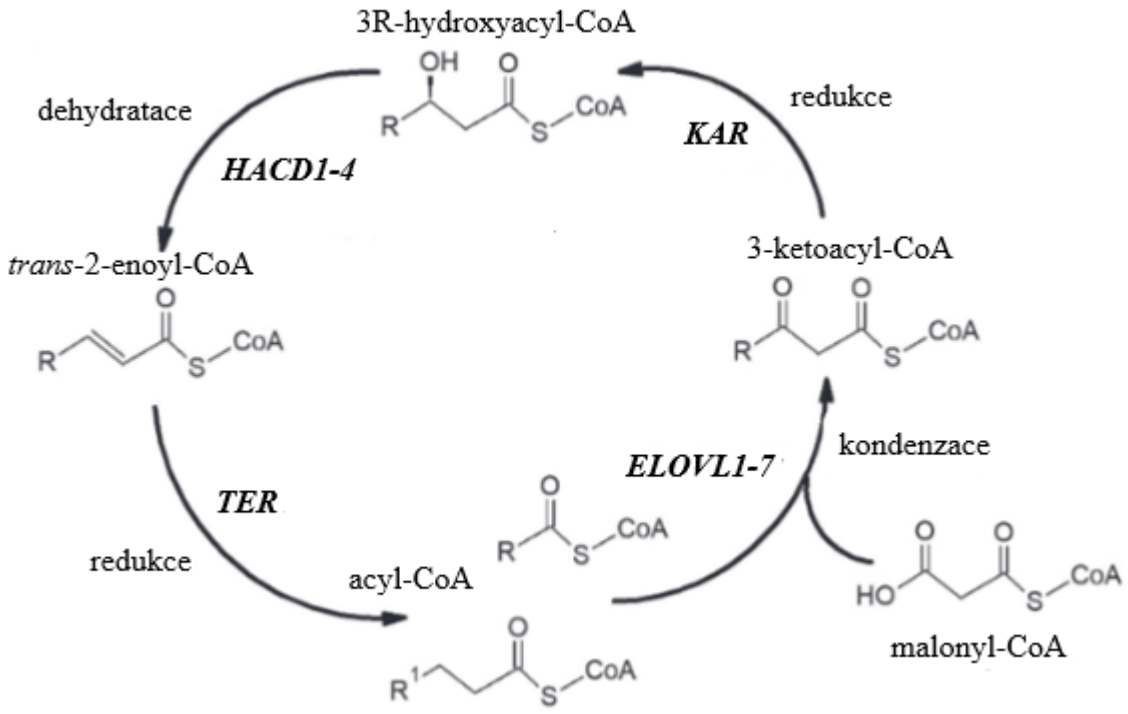
Spektrum mastných kyselin je dáno jejich příjmem potravou, endogenní syntézou a dalším metabolismem (elongace, desaturace a degradace beta-oxidací). Mastné kyseliny se u každého jedince liší v závislosti na jeho etnickém, rasovém a genetickém původu, také na onemocněních, které člověk prodělal. (Zeman, 2019)

Malé množství mastných kyselin nacházející se v těle v neesterifikované formě lze nazvat jako volné mastné kyseliny (FFA) (Кольман, 2019). Jsou důležitými zdroji energie pro většinu tělesných tkání a podle alifatické délky ocasu je lze rozdělit do tří skupin: mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) mají do 6-ti atomů uhlíků, mastné kyseliny se středním řetězcem (MCFA) mají 6 – 12 atomů uhlíků, mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA) mají 13 – 21 uhlíků a mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA) mají více jak 22 uhlíků. Volné mastné kyseliny jsou vždy vázány na transportní protein, jako je např. albumin. (Kimura, 2019; Zeman, 2019)

1.2.2.2.1 Biosyntéza mastných kyselin

Mastné kyseliny jsou přijímány potravou a jsou i syntetizovány v organismu. Výchozí látkou pro syntézu je acetyl-CoA a hlavním místem syntézy jsou játra a tukové buňky. Syntéza je iniciována typicky po jídle, kdy glykolýzou vzniká v buňkách velké množství acetyl-CoA a jeho energetická potřeba je malá. Syntéza mastných kyselin probíhá v cytoplazmě, kde dochází k postupnému spojování a redukci dvouuhlíkatých zbytků kyseliny octové. Jde o opakující se sled čtyř reakcí. Na připojení jedné molekuly acetyl-CoA se spotřebovávají 2 NADPH a 1 ATP. (Táborská, 2016)

„De novo“ syntézou vznikají v cytoplazmě nasycené mastné kyseliny až po kyselinu palmitovou. Mastné kyseliny s vyšším počtem uhlíků se vytvářejí v endoplazmatickém retikulu nebo mitochondriích procesem elongace. V mikrozomech probíhá elongace ve 4 cyklech – kondenzace, redukce, dehydratace a redukce za účasti mastných kyselin s více než 12 uhlíky (viz Obrázek 3) (Zeman, 2019).



Obrázek 3 – Prodlužování mastných kyselin u savců. Upraveno podle (Zeman, 2019).
HACD – 3-hydroxyacyl-CoA dehydratáza, *TER* – *trans*-2-enoyl-CoA reduktáza, *ELOVL* – elongace (prodlužování mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem), *KAR* – 3-ketoacyl-CoA reduktáza.

Nenasycené mastné kyseliny vznikají působením desaturas na nasycené mastné kyseliny v endoplazmatickém retikulu. Vzhledem ke specifitě enzymů nelze některé nenasycené mastné

kyseliny u člověka syntetizovat, a proto musí být přijímány z vnějšího prostředí. Prvním krokem desaturace je vytvoření dvojné vazby na devátém uhlíku kyseliny palmitové nebo stearové, pomocí Δ9 desaturasy, kterou má většina organismů. Živočichové tvoří další dvojné vazby pouze v oblasti mezi dvojnou vazbou a karboxylovým koncem (Δ6 a Δ5 desaturasy). Rostliny mají Δ12 a Δ15 desaturasu, kde Δ15 desaturasa se nachází u rostlin vegetujících ve studené vodě (plankton, řasy). (Táborská, 2016)

1.2.2.2.2 Odbourávání mastných kyselin

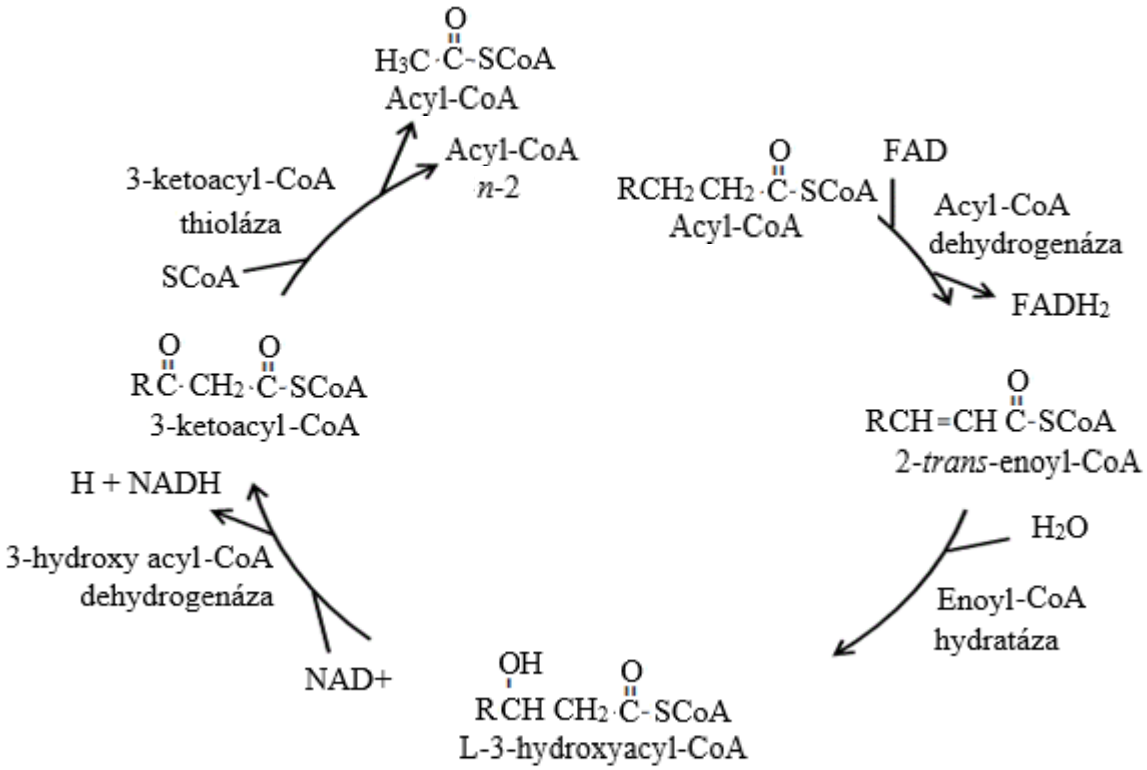
Oxidace mastných kyselin probíhá v mnoha oblastech buňky lidského těla. V mitochondriích probíhá beta-oxidace, v peroxisomech alfa- i beta- oxidace a v endoplazmatickém retikulu probíhá omega-oxidace. Oxidace mastných kyselin je zdrojem metabolické energie. (Talley, 2021)

V srdečním nebo kosterním svalu vede mitochondriální oxidace k produkci substrátu pro citrátový cyklus ve formě acetyl-CoA a poskytuje ATP pro myocyty. V hepatocytech oxidace mastných kyselin poskytuje acetyl-CoA, který slouží k syntéze ketolátek během dlouhodobého hladovění či vyčerpání zásob glykogenu. Mitochondriální beta-oxidace (viz Obrázek 4) vyžaduje 4 kroky a poskytuje na 1 kolo oxidace 4 jednotky ATP ve formě molekuly NADH, $FADH_2$ a acetyl-CoA. (Talley, 2021)

V prvním kroku je zapotřebí enzym acyl-CoA dehydrogenáza. Enzym katalyzuje tvorbu *trans* dvojné vazby mezi uhlíky alfa a beta, dojde k odstranění 2 elektronů za vzniku $FADH_2$, což odpovídá 1,5 molekule ATP. Ve druhém kroku dojde k hydrataci dvojné vazby mezi uhlíky alfa a beta, k čemuž je potřeba enoyl-CoA hydratáza. Hydratace přidá proton vodíku k alfa uhlíku a hydroxylovou skupinu k uhlíku beta. V tomto kroku nedochází ke tvorbě energie. V následujícím kroku beta-hydroxy acyl-CoA dehydrogenáza odstraní elektrony a 2 protony z hydroxylové skupiny a beta uhlík se oxiduje a produkuje molekulu NADH, která odpovídá 2,5 molekulám ATP. V závěrečném kroku dochází za přítomnosti enzymu ketoacyl-CoA k thiolytické reakci, při které dochází ke štěpení vazby mezi alfa a beta uhlíkem a produkci acetyl-CoA a mastný acyl-CoA je o 2 uhlíky kratší. Tento proces se může opakovat tak dlouho, dokud není mastná kyselina se sudým počtem uhlíků zcela přeměna na acetyl-CoA. Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků podléhají beta-oxidaci stejným způsobem jako kyseliny se sudým počtem, avšak s rozdílem, že na konci cyklu vzniká z pětiuhlíkatého řetězce acetyl-CoA a propionyl-CoA, který může být dále 3 enzymy (propionyl-CoA karboxyláza, methylmalonyl-

CoA epimeráza, methylmalonyl-CoA mutáza) přeměněn na sukcinyl-CoA, čímž je beta-oxidace spojena s citrátovým cyklem. (Fillmore, 2021; Talley, 2021)

Peroxisomální beta-oxidace je zaměřená na metabolismus kyselin s velmi dlouhým řetězcem, alfa-oxidace slouží k degradaci vedlejších produktů chlorofylu – složek zelené zeleniny ve stravě. Omega-oxidace je zaměřena na zpracování velkých a ve vodě nerozpustných mastných kyselin, které by byly jinak ve vyšších koncentracích pro buňku toxické. (Talley, 2021)



Obrázek 4 – Čtyři kroky u beta-oxidace mastných kyselin se sudým počtem uhlíků. Upraveno podle: (Fillmore, 2021). *NAD* – nikotinamidadenindinukleotid, *NADH* – nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma), *FAD* – flavinadenindinukleotid, *$FADH_2$* – flavinadenindinukleotid (redukovaná forma).

1.2.2.3 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou syntetizovány ve dvojvrstvě endoplazmatického retikula a poté baleny do organel, které jsou nazývány jako lipidové kapičky. K biogenezi lipidových kapének dochází během energeticky bohatých nebo stresových podmínek. Biogeneze lipidových kapének začíná syntézou neutrálních lipidů, jako jsou triacylglyceroly nebo estery sterolů obklopených fosfolipidovou monovrstvou. (Caillon, 2020).

Triacylglyceroly patří mezi acylglyceroly, což jsou estery glycerolu s mastnými kyselinami. Právě podle počtu esterifikovaných hydroxylových skupin na molekule glycerolu vznikají mono-, di-, triacylglyceroly. Pouze triacylglyceroly se vyskytují v přírodních olejích a tucích. (Spilková, 2016)

Triacylglyceroly jsou syntetizovány postupnou esterifikací glycerol-3-fosfátu mastnými kyselinami. Mastné kyseliny vstupují do esterifikačních reakcí v aktivované formě, tedy vázané na acetyl-CoA. (Táborská, 2016) Jsou-li všechny tři mastné kyseliny totožné, je triacylglycerol označován jako jednoduchý. Pokud jsou mastné kyseliny odlišné, vzniká směsný triacylglycerol. V rostlinných olejích se na sekundární hydroxyl glycerolu obvykle váže nenasycená mastná kyselina s kratším řetězcem (do C_{18}), zbylé dvě masné kyseliny mohou být nasycené i nenasycené, ale mají zpravidla delší řetězec. V živočišných tucích se na druhý uhlík glycerolu váže nejčastěji nasycená mastná kyselina. (Spilková, 2016)

Nenasycené mastné kyseliny mají nižší teplotu tání než nasycené mastné kyseliny se shodným počtem uhlíků, což má za následek to, že oleje s vysokým počtem acylglycerolů nenasycených mastných kyselin jsou za normální teploty tekuté, zatímco tuky, ve kterých převažují nasycené mastné kyseliny jsou tuhé nebo polotuhé. Tuky s nasycenými kyselinami jsou na vzduchu stálé, naopak oleje s nenasycenými kyselinami podléhají vlivem světla, kyslíku a vlhkosti určitým změnám, kdy vznikají peroxidy a následně dochází k izomerizaci a polymeraci. (Spilková, 2016)

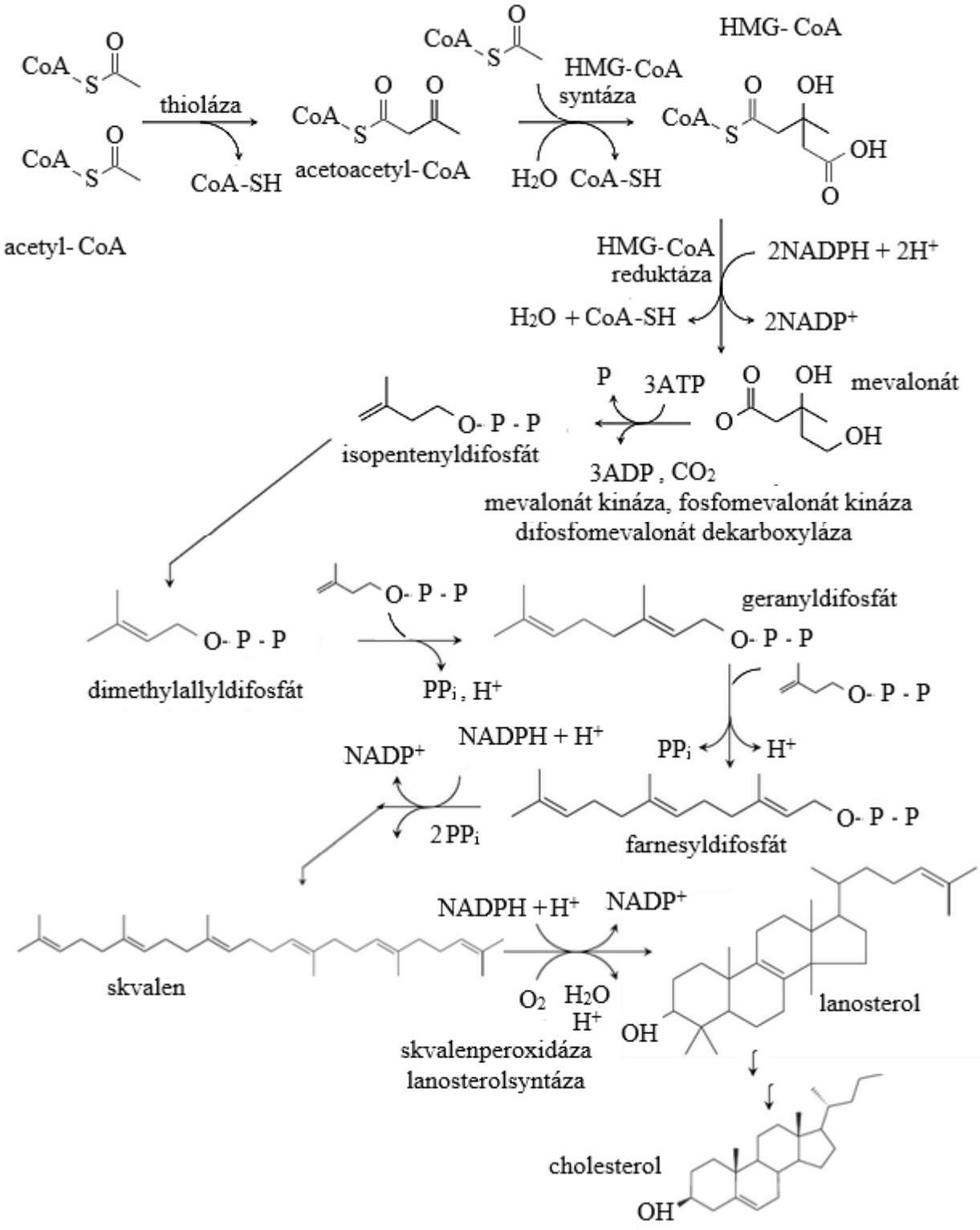
Referenční rozmezí triacylglycerolů v ušním mazu je 0,45 – 1,70 mmol/l (Pokorný, 2007).

1.2.2.4 Cholesterol

Cholesterol je důležitou složkou buněčných membrán. Dostává se do těla potravou, nebo vzniká syntézou *de novo*. Syntéza cholesterolu (viz Obrázek 5) probíhá z acetyl-CoA, který lze získat např. z beta-oxidace mastných kyselin.

Prvním krokem syntézy je vznik meziproduktu mevalonátu. Nejprve reagují 2 molekuly acetyl-CoA a za katalýzy thiolázou vzniká acetoacetyl-CoA, který dále kondenzuje s třetí molekulou acetyl-CoA za katalýzy HMG-CoA syntázy a vzniku šestiuhlíkaté sloučeniny *β*-hydroxy-*β*-methylglutaryl-CoA (dále HMG-CoA). Mevalonát vzniká redukcí HMG-CoA za katalýzy HMG-CoA reduktázy v hladkém endoplazmatickém retikulu. Mevalonátu se po 3 fosforylacích katalyzovaných kinázou a po následné dekarboxylaci přeměňuje

na isopentenyldifosfát (C5), který se dále mění na izoprenové meziprodukty geranyldifosfát (C10), farnesyldifosfát (C15). Po spojení dvou molekul farnesyldifosfátu vzniká lineární molekula skvalen (C30), která se cykluje do prvního sterolového meziproduktu – lanosterol. Reakce je katalyzována skvalenperoxidázou a lanosterolsyntázou. Lanosterol je po několika modifikacích přeměněn na cholesterol (LeClair, 2021; Palmer, 2014)



Obrázek 5 – Syntéza cholesterolu. Upraveno dle: (Palmer, 2014). *HMG-CoA* – *β*-hydroxy-*β*-methylglutaryl-CoA

1.2.2.4.1 Skvalen

Skvalen je polynenasycený uhlovodík ($C_{30}H_{50}$), který můžeme nalézt ve 13 % v lidském mazu. Ve vyšším zastoupení ho lze nalézt v rybích olejích, převážně v olejích ze žraločích jater. V nižším množství se vyskytuje i v rostlinných olejích. Skvalan je nasycený derivát skvalenu, který můžeme nalézt ve stejných zdrojích jako skvalen. Látky byly několikrát studovány a výsledky na zvířecích modelech *in vitro* potvrdily protirakovinné, antioxidační, detoxikační, hydratační a zvláčňující účinky látek. Podle výsledků studií byly látky zařazeny na seznam důležitých látek v praktickém i klinickém užívání s velkým potenciálem ve farmaceutickém průmyslu (Kim, 2012).

1.3 Chromatografie

Chromatografie patří mezi účinnou analytickou techniku, která se široce používá v laboratořích po celém světě. Své uplatnění má nejen v biologických a chemických oborech, ale i v ropném průmyslu, kdy se technika používá k analýze komplexních směsí uhlovodíků (Keller, 2021). Separační analytické metody se používají k podrobné analýze organických látek. Pokud je materiál tvořen větším počtem rozdílných složek je v první řadě nutné jednotlivé složky od sebe oddělit, aby je bylo možné samostatně detekovat. Na základě kvalitativní i kvantitativní analýzy složek lze charakterizovat původní analyzovanou látku. (Kopecká, 2019)

Teprve po zjištění typu látky (bílkovina, olej, …) lze použít rozdělovací analýzu. Jedná se o invazivní a destruktivní metody, což znamená, že odebraný vzorek bude během analýzy zničen. Před analýzou je nutné vzorek připravit. Odebraný materiál musí být separován, rozpuštěn a přečištěn. Někdy je nutné vzorek rozštěpit na jednotlivé složky (hydrolýzou nebo pyrolýzou (vysokou teplotou)) nebo provést derivatizaci, tzn. chemickou reakcí dojde k převedení na jinou sloučeninu (derivát původní analyzované látky). (Kopecká, 2019)

1.3.1 Princip a dělení chromatografie

Metoda rozděluje smíšené sloučeniny na jednotlivé složky. K separaci je používána mobilní a stacionární fáze. Mobilní fáze může být plyn nebo kapalina, stacionární fáze je pevná látka nebo kapalina (viz Tabulka 1). Kinetický molekulární pohyb neustále vyměňuje molekuly rozpuštěných látek mezi fázemi. Čas, který rozpuštěná látka stráví v určité oblasti odpovídá poměru koncentrací v určitých oblastech, tento poměr je znám jako rozdělovací koeficient. (Keller, 2021; Koplík, 2007)

Analyzované látky jsou v průběhu chromatografické analýzy unášeny mobilní fází v separačním prostoru, a přitom jsou rozděleny mezi stacionární a mobilní fázi podle velikosti molekul a polarity. Volbou polarity mobilní a stacionární fáze lze ovlivnit pohyb analyzované látky v separačním prostoru a tím i její eluční čas, který je pro danou látku v daných podmínkách specifický. Eluční čas je doba, za kterou projde analyt separačním prostředím od nástřiku do detektoru. Nepolární látky se nejlépe rozpouští v nepolárních rozpouštědlech a naopak. Složky, které se přednostně vyskytují ve stacionární fázi se budou během průchodu separačním prostředním opožďovat vzhledem ke složce, která se přednostně vyskytuje v mobilní fázi a projdou rychleji chromatografických prostorem. V tomto důsledku se jednotlivé složky při průchodu separačním prostředím od sebe oddělují a vzdalují. Na konci lze identifikovat jednotlivé složky samostatně (Kopecká, 2019).

Mobilní fází může být kapalina (tenkovrstvá chromatografie, dále TLC, kapalinová chromatografie, dále LC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dále HPLC, iontová chromatografie, dále IC), nebo inertní plyn (plynová chromatografie, dále GC). Stacionární fáze bývá polymerní sorbent nebo povlak na vnitřní stěně kolony (Kopecká, 2019).

Tabulka 1 – Rozdělení separačních metod. Upraveno dle: (Nikolova, 2014, Vávrová, 2004).

hlavní typ chromatografie	**mobilní fáze**	**stacionární fáze**	**název**	**zkratka**	**mechanismus separačního procesu**
plynová chromatografie (GC – gass chromatography)	plyn	kapalina	plynová rozdělovací chromatografie	GLC	rozdělování, rozdělovací, rovnováha
		pevná látka	plynová adsorpční chromatografie	GSC	adsorpce, adsorpční izoterma, síťový efekt
kapalinová chromatografie (LC – liquid chromatography)	kapalina	kapalina	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC	rozdělování, rozdělovací, rovnováha
			gelová permeační chromatografie	GPC	síťový efekt
			papírová chromatografie	PC	adsorpce, adsorpční izoterma
			tenkovrstvá chromatografie	TLC	
		pevná látka	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC	
			iontově výměnná chromatografie	IEC	iontová výměna, výměnná rovnováha
			tenkovrstvá chromatografie	TLC	adsorpce, adsorpční izoterma

TLC chromatografie jako rozdělovací (stacionární fáze je kapalina zakotvená na pevné desce) i jako adsorpční (stacionární fází je tuhá látka) chromatografie

Rozdělení chromatografie dle uspořádání

- Chromatografie v plošném (planárním) uspořádání
    - Papírová chromatografie (PC)
    - Tenkovrstvá chromatografie (TLC)
- Chromatografie v kolonovém (sloupcovém) uspořádání

Rozdělení chromatografie dle skupenství fází

- Kapalinová chromatografie (LC) – mobilní fáze kapalina
    - Chromatografie kapalina-tuhá látka (LSC)
    - Chromatografie kapalina-kapalina
- Plynová chromatografie (GC) – mobilní fáze plyn
    - Chromatografie plyn-kapalina (GLC)
    - Chromatografie plyn-tuhá látka (GSC)
- Superkritická fluidní chromatografie (SFC) (Koplík, 2007)

Základní rozdělení dle separačního principu (mechanismu)

- Adsorpční chromatografie
- Rozdělovací (partiční) chromatografie
- Iontová výměna (Nikolova, 2014).

1.3.2 Historie

První aplikaci chromatografie provedli chemici, kteří testovali směsi barviv ponořením šňůr, kousků látky nebo filtračního papíru do barvící kádě. Roztok barviva kapilárním působením migroval po vloženém podkladu a složky barviva vytvářely pásy různých barev (Keller, 2021).

V 19. století pár německých chemiků provedlo cílevědomé experimenty, které vedly k hlubšímu prozkoumání tohoto jevu. Chemici pozorovali vývoj soustředných barevných prstenců, které vznikly po nakapání roztoků anorganických sloučenin na střed filtračního papíru. Roku 1861 vydal Friedrich Goppelsröder článek, ve kterém metodu důkladně popisuje a nazve ji jako kapilární analýzu (Keller, 2021).

Avšak objev chromatografie je přisuzován ruskému botanikovi Michailovi S. Tsvetovi, který v roce 1901 odhalil fyzikálně-chemický základ separace. Svůj objev racionálně a organizovaně uplatnil při separaci rostlinných pigmentů (karotenoidy a chlorofyly). Tsvet popsal techniku, která se ve stejné formě používá prakticky dodnes. K pokusu použil vertikální skleněnou kolonu s adsorpčním materiálem (Al_2O_3, SiO_2 nebo práškový cukr), na vrchol kolony přidal roztok rostlinných pigmentů, který promyl organickým rozpouštědlem. Pigmenty se na sloupci rozdělily do řady barevných pásů bez pigmentu. Jelikož pracoval Tsvet s barevnými látkami, nazval metodu chromatografie. V překladu z řečtiny jde o složeninu dvou slov: *chromos* (barva) a *graphein* (psaní). Protože Tsvet publikoval své poznatky převážně v německých botanických časopisech, nebo ruských dílech, neměl západní svět o existenci chromatografie ponětí. (Keller, 2021, Nikolova, 2014)

Až roce 1931 se chromatografie vymanila z relativní nejasnosti. Přispěli k tomu německý chemik Richard Kuhn a jeho francouzský student Edgar Lederer, kteří použili chromatografii k rozlišení řady biologicky důležitých materiálů. O deset let později, tedy v roce 1941, začali britští chemici Richard L. M. Synge a J. P. Martin studovat složení aminokyselin ve vlně. První použitá technika – protiproudá distribuce kapalina-kapalina, jim však neposkytla adekvátní oddělení aminokyselin. Byli nuceni vymyslet alternativní způsob, při kterém byla jedna kapalina pevně spojena s jemně granulovanou pevnou látkou zabalenou do skleněné trubice. Druhá kapalina, která je s první nemísitelná, prosakovala skrze ni. Jako granulovaná pevná látka byl použit silikagel a mobilní fází byl chloroform. Martin a Synge představili gel složený z krystalů SiO_2, které jsou těsně spojeny s vodou. Mechanicky je metoda shodná s Tsvetovým přístupem, avšak byla označena za inovativnější. Nová metoda zahrnovala koncept stacionární kapaliny (vody) nesené na inertní pevné látce (SiO_2), což způsobilo, že molekuly rozpuštěné látky se rozdělily mezi stacionární a mobilní (chloroform) kapalinu. Metoda byla nazvána jako překážková chromatografie (Keller, 2021).

Martin a Synge již v této době navrhovali použít jako pohybující fázi plyn. Tato myšlenka byla deset let přehlížena. Svůj podíl na tom jistě má i probíhající válka. Martin se však svého snu nevzdal a se svým spolupracovníkem britským chemikem Anthonym T. Jamesem započali studie dělící chromatografie plyn-kapalina (Keller, 2021).

Martin a Synge získali v roce 1952 Nobelovu cenu za svou práci, převážně za matematickou teorii a model, který navrhoval jiné systémy, které lze použít pro separaci peptidů a aminokyselin se značným dopadem na biochemické studie (Keller, 2021).

Počátky dělící chromatografie představovaly potíže z důvodu nedostatečné reprodukovatelnosti vlastností silikagelu a nedostatečné uniformity v balení kolon. Martin a jeho spolupracovníci byli nuceni vypracovat nový postup. Jako stacionární fázi použili list filtračního papíru. Tato technika umožnila požadovanou reprodukovatelnost a od 40. let minulého století ji známe jako papírovou chromatografii. Technika našla své uplatnění při analýze řady biologických sloučenin, např. sacharidy, aminokyseliny, steroidy…. V tomto poli byla do jisté míry nahrazena sloupcová chromatografie. Podobný nápad měli i dva sovětští lékárníci Nikolay A. Izmaylov a Maria S. Shrayberová, kteří distribuovali podpůrný materiál jako tenký film na skleněné desce. S deskovým i podpůrným materiálem by bylo možné manipulovat jako u papírové chromatografie. Výsledky sovětských studií byly známy již od roku 1938, avšak až do roku 1956 nebyly další výzkumy realizovány. V tomto roce provedl německý chemik Egon Stahl výzkum aplikace a celý systém nazval jako chromatografie na tenké desce (TLC) (Keller, 2021).

Plynová chromatografie byla poprvé provedena v roce 1944 chemikem Erikem Cremerem na území Rakouska. Cremer použil pevnou stacionární fázi. Tato metoda byla prvotně použita v roce 1952 Martinem a Jamesem, kdy uvedli eluční plynovou chromatografii aminů a organických kyselin. Malé částice nosného plynu byly potaženy netěkavou kapalinou a zabaleny do vyhřívané skleněné trubice. Tato metoda byla rozpoznána ropnými chemiky jako rychlá a jednoduchá metoda analýzy komplexních uhlovodíkových směsí, které nalézáme v ropných produktech. V roce 1957 Marcel J.E. Golay dospěl k závěru, že dlouhá kolona (90 – 180 m) s úzkým vnitřním průměrem (0,25 μm) a se stěnou potaženou tenkým filmem kapaliny poskytuje nejlepší separace. Díky detektorům s nízkými limity detekce lze oddělit až stovky složek v malém vzorku směsi v jednom experimentu. (Keller, 2021)

V roce 1964 americký chemik J. Calvin Giddings, s odkazem na teorii pro plynovou chromatografii, shrnul nezbytné podmínky, které by poskytly kapalinové chromatografii rozlišovací schopnost. Doporučil velmi malé částice s tenkým filmem stacionární fáze o malém průměru kolony. Technika se nazývá jako vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). (Keller, 2021)

Iontově výměnná chromatografie byla použita roku 1938 T. I. Taylorem a Haroldem C. Urey. Větší pozornost se jí dostalo v roce 1942, kdy byla použita k oddělení vzácných zemin a transuranových prvků, štěpných produktů uranu a dalších prvků. Iontoměničovou

chromatografii lze aplikovat pro separaci organických iontů, nukleových kyselin a aminokyselin. (Keller, 2021)

Již v roce 1879 byla pozorována rozpustnost pevných látek v plynech za vysokého tlaku. Britský vědec James Lovelock v roce 1958 navrhl, že plyny nad jejich kritickou teplotou lze při vysokém tlaku použít jako mobilní fázi. Látku v tomto stavu nazýváme jako superkritickou tekutinu. Superkritická kapalinová chromatografie překlenuje mezeru mezi kapalinovou a plynovou chromatografií. Mezi výhody metody řadíme možnost analyzovat i nestabilní sloučeniny, vysokou rychlost metody i její rozlišení. (Keller, 2021)

V roce 1968 Pedro Cuatrecasas a jeho spolupracovníci poprvé popsali techniku afinitní chromatografie. Při těchto separacích se biomolekula (enzym) naváže na substrát, který je připojen k pevné fázi. Ostatní složky jsou eluovány. Změnou chemických podmínek separace lze zajistit eluci vázané molekuly na substrát (Keller, 2021).

Poslední zmíněná separační technika je založena na nerovnoměrné rychlosti tekutiny proudící trubkou. V oblasti sousedící se stěnou je tekutina téměř nehybná a ve středu kanálu dosahuje maximální rychlosti. V roce 1966 Giddings navrhl, že k selektivnímu přitahování částic ke stěně, kde se budou pohybovat pomalu lze použít elektrické nebo gravitační pole. K migraci částic byl použit i tepelný gradient mezi dvěma stěnami. Technika byla označena jako jednofázová chromatografie, jelikož neexistuje stacionární fáze a byla pojmenována jako frakcionace toku pole (Keller, 2021).

1.3.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Tenkovrstvá chromatografie je separační metoda, u které je stacionární fáze vhodný materiál, který je nanesen v tenké vrstvě na skleněnou, plastovou nebo kovovou desku. Roztoky stanovovaných látek se na desku nanášejí před vyvíjením. Separace je založena na adsorpci, rozdělení, iontové výměně nebo na kombinaci mechanismů a dochází k ní migrací rozpuštěných látek v rozpouštědle nebo vhodné směsi rozpouštědel (mobilní fáze) tenkou vrstvou (stacionární fáze) (Ludvík, 2017).

Tenkovrstvá chromatografie je nejlevnější a nejjednodušší chromatografická metoda. Metoda nevyžaduje žádnou instrumentaci. Na TLC desce lze oddělit více než jednu sloučeninu. TLC desky nemají dlouhé stacionární fáze a detekční limit je vysoký. TLC funguje jako otevřený systém, proto teplota i vlhkost mohou ovlivnit výsledky chromatogramu (Rogers, 2019).

Používá se často k orientačnímu stanovení cukrů, bílkovin, vosků nebo přírodních barviv. Mezi podmínky této metody patří, že odebraný vzorek musí být vždy před analýzou rozpuštěn a je nutné znát typ látky (bílkoviny, polysacharidy, lipidy), která podmiňuje správný výběr mobilní a stacionární fáze. Doporučuje se znalost retenčních faktorů dělených složek nebo možnost jejich porovnání se známými standardy. Jde o kvalitativní metodu (Kopecká, 2019). V žádném případě by se nemělo na čelní stranu desky TLC sahat prsty, jelikož by mohla kontaminace kožními oleji zatemnit výsledky. Desku je doporučeno uchopovat za okraje nebo případně kleštěmi (Rogers, 2019).

Stacionární fáze (viz Tabulka 2) je polymerní sorbent nanesený na skleněné, plastové nebo hliníkové desce (Kopecká, 2019). Skleněné desky jsou chemicky inertní a nejlépe odolávají teplu a reaktivním skvrnám. Naopak hliníkové desky nemusí odolat kyselým skvrnám a plastové desky nevydrží vysoké teploty, kterých je nutné dosáhnout k vyvíjení skvrn. Skleněné desky jsou křehké a řezání je obtížné, hliníkové a plastové desky jsou pružné, což má za následek odlupování stacionární fáze (Rogers, 2019). Nejběžnějším sorbentem bývá silikagel, křemelina, celulóza nebo alumina (Kopecká, 2019).

Tabulka 2 – Stacionární fáze a způsob separace. Upraveno podle: (Rogers, 2019).

Stacionární fáze	**Chromatografický mechanismus**	**Typická aplikace**
Silikonový gel	adsorpce	steroidy, aminokyseliny, alkoholy, uhlovodíky, lipidy, kyseliny, aflatoxin, žluč, alkaloidy, vitamíny
Silica Gel RP	obrácená fáze	mastné kyseliny, steroidy, vitamíny, hormony, karotenoidy
Celulóza, křemelina	rozdělit	sacharidy, cukry, alkoholy, aminokyseliny, karboxylové kyseliny, mastné kyseliny
Oxid hlinitý	adsorpce	aminy, steroidy, alkoholy, lipidy, aflatoxin, vitamíny, žlučové kyseliny, alkaloidy
PEI celulóza	iontová výměna	nukleotidy, nukleové kyseliny, nucelosidy, puriny, pyrimidiny
Křemičitan hořečnatý	adsorpce	steroidy, lipidy, pesticidy, alkaloidy

Mobilní fáze je většinou směs organických rozpouštědel (Kopecká, 2019). Správný výběr rozpouštědla patří mezi nejdůležitější aspekty TLC a jeho výběr může vyžadovat určité množství pokusů. Pro správný výběr rozpouštědla je nutné uvažovat i chemické vlastnosti analytů (Rogers, 2019).

Kapalný nebo rozpuštěný vzorek je nanesen na spodní okraj desky, avšak nad hladinu mobilní fáze (Kopecká, 2019). K nanášení skvrn na destičku se používají tenké skleněné pipety (Rogers, 2019). Deska je poté umístěna do nádoby, který obsahuje mobilní fázi s nasycenou

atmosférou par mobilní fáze (Kopecká, 2019). Nádoba může být sklenice se širokým hrdlem, nebo speciální kusy pro uložení velkých talířů. Vrch nádoby by měl být zakryt víkem nebo jiným krytem, aby bylo minimalizováno odpařování (Rogers, 2019). Skvrna rozpuštěného analyzovaného materiálu je poté unášena mobilní fází, vzlínajícím ve vrstvě sorbentu a během průchodu stacionární fází se rozdělí na jednotlivé složky. Poté co se čelo mobilní fáze přiblíží k hornímu okraji desky, je deska vyjmuta a skvrny jednotlivých složek jsou vybarveny různými činidly nebo vizualizovány pod UV světlem (Kopecká, 2019). Velikosti skvrn na TLC desce by neměly být větší než 1 – 2 mm v průměru (Rogers, 2019). Délka dráhy jednotlivých složek je charakterizována tzv. retenčním faktorem *R*. Retenční faktor je podíl vzdálenosti skvrny od startu a vzdálenosti čela od startu (Kopecká, 2019). Pokud je sloučenina rozpustná v rozpouštědle bude na TLC desce v delší vzdálenosti od startu. Naopak pokud má sloučenina ráda stacionární fázi nebude od startu příliš daleko, jelikož se na stacionární fázi přilepí (Rogers, 2019).

1.3.3.1 Hodnocení

Zásady, kyseliny a silně polární sloučeniny vytvářejí v neutrálních rozpouštědlech pruhy nikoli skvrny. Pruhy lze u kyselin napravit přidáním kyseliny octové či mravenčí do rozpouštědla. U zásad se přidává trimethylamin a u polárních rozpouštědel methanol (Rogers, 2019).

Tato metoda je využívána nejen jako záchytová metoda i jako identifikační metoda. Pro některé látky jsou specifické barevné reakce, které jsou provázeny typickým spektrem metabolitů. Jiné látky lze identifikovat pomocí typické fluorescence atd (Hirt, 2016).

Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku je vizuálně porovnána s odpovídající skvrnou na chromatogramu porovnávajícího roztoku. U skvrn lze porovnat jejich zbarvení, velikost a retardační faktor (Ludvík, 2017).

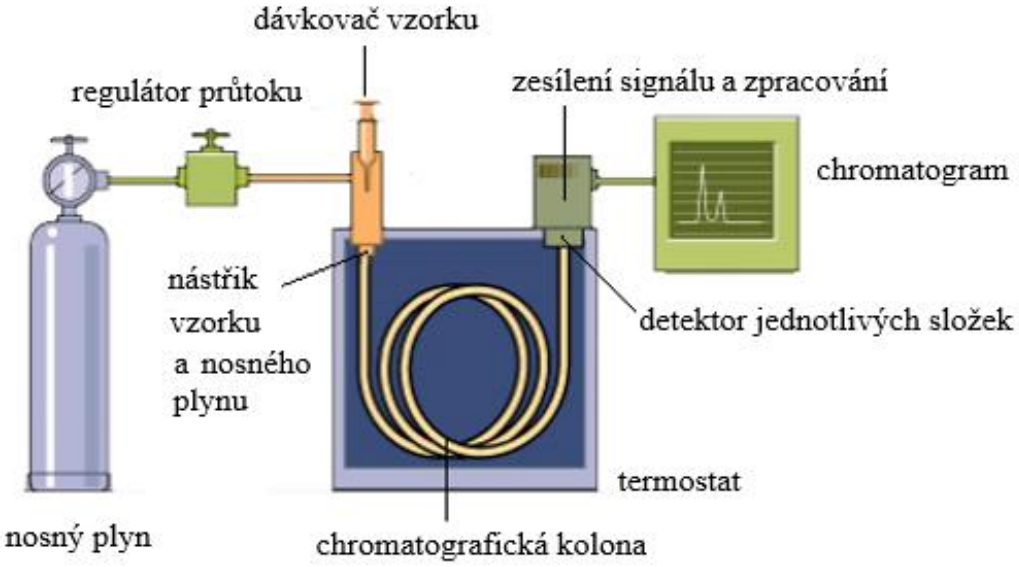
Látky rozdělené na TLC, které lze detekovat v ultrafialové a viditelné oblasti spektra, jsou stanoveny přímo na desce s vrstvou a za použití vhodného vybavení. Desku s vrstvou lze hodnotit měřením reflektance dopadajícího světla, kdy se pohybuje měřící zařízení nebo samotná deska. Podobně lze použít fluorescenci. Dále je možné desku rozstříhat nebo vyškrábat stacionární fázi, kterou po rozpuštění lze dále analyzovat vhodným způsobem (Ludvík, 2017).

1.3.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda, která je založena na rozdílné distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fáze je nosný plyn, který se pohybuje skrz nebo podél stacionární fáze umístěné na koloně. Tuto separační metodu lze použít pro látky a jejich deriváty, které lze za vysokých teplot převést do plynné fáze. Plynová chromatografie je založena na mechanismu adsorpce, vylučování a rozdělování (Ludvík, 2017).

Přístroj používaný u plynové chromatografie se nazývá plynový chromatograf. Látka musí být těkavá a termicky stabilní, aby bylo možné ji použít k GC. Netěkavé látky je nutné derivatizovat (Nikolova, 2014).

Přístroj pro plynovou chromatografii (viz Obrázek 6) se skládá z tlakové lahve, dávkovacího zařízení, termostatu, ve kterém je umístěna chromatografická kolona, detektoru a systému pro zpracování dat. Nosný plyn protéká kolonou kontrolovanou rychlostí nebo do detektoru při kontrolovaném tlaku. Stanovení lze provést při daném teplotním programu nebo konstantní teplotě (Ludvík, 2017).



Obrázek 6 – Plynová chromatografie – schéma. Upraveno podle: (McNair, 2021).

Stacionární fáze jsou umístěny v kolonách. Stacionární fáze může pokrývat stěny křemenné kapilární kolony. Dále můžeme mít kolony naplněné pevnou stacionární fází, nebo inertními částicemi impregnovanými stacionární fází (Ludvík, 2017).

Vnitřní průměr kapilárních kolon se pohybuje mezi 0,1 mm až 0,53 mm a délka kolon dosahuje od 5 m až po 60 m. Stacionární fáze nebo kapalina, která může být chemicky vázaná na vnitřní povrch kolony, vytváří film o tloušťce 0,1 μm až 5,0 μm (Ludvík, 2017).

Vnitřní průměr náplňových kolon se pohybuje v rozmezí mezi 2 mm až 4 mm a délka těchto kolon vyrobených z kovu nebo ze skla je 1 m až 3 m. Stacionární fáze jsou nejčastěji porézní polymery nebo tuhé nosiče impregnované kapalnou fází (Ludvík, 2017).

Retenční čas určité složky a účinnost kolony závisí na průtokové rychlosti nosného plynu. Retenční čas je přímo úměrný délce kolony, rozlišení je přímo úměrné druhé odmocnině délky kolony. Průtoková rychlost nosného plynu se u náplňových kolon vyjadřuje v mililitrech za minutu při atmosférickém tlaku a teplotě místnosti. Měří se na výstupu z detektoru pomocí kalibrovaného mechanického zařízení nebo bublinkového průtokoměru. Chromatografická kolona je pomocí termostatu udržována na pracovní teplotě. Nejčastějšími nosnými plyny pro náplňové kolony jsou helium a dusík, pro kapilární kolony je to ještě navíc vodík (Ludvík, 2017).

Nejčastěji používaný detektor je plamenoionizační. Lze používat i jiné detektory jako např. detektor elektronového záchytu, dusíko-fosforový, hmotnostní spektrometr, tepelně vodivostní a další (Ludvík, 2017).

1.3.4.1 Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem je analytická metoda kombinující vysokou separační schopnost plynové chromatografie s detekcí metodou hmotnostní spektrometrie zajišťující vyšší účinnost analýz vzorků (Cheriyedath, 2019). Plynová chromatografie dokáže oddělit těkavé složky ve vzorku, hmotnostní spektrometrie pomáhá fragmentovat složky a identifikovat je na základě poměru hmotnosti k náboji (Cheriyedath, 2019). Vzorek může být různého skupenství – kapalný, pevný či plynný. Ionizace znamená, že je vzorek vystaven elektronovému bombardování. Výsledné molekuly ve vzorku se nabijí a buď zachovávají celou strukturu, nebo se fragmentují. Tyto nefragmentované či fragmentované molekuly jsou rozděleny podle poměru hmotnosti a náboje. Dále jsou vystaveny magnetickému nebo elektrickému poli a k výpočtu nám slouží i parametr odkloněné dráhy nabité molekuly k detektoru. Výsledné spektrum je intenzita signálu detekovaných iontů v závislosti na poměru

hmotnosti a náboje (Webster, 2021). Hmotnostní spektroskopie je vysoce specifická pro daný analyt a díky ní lze získat informace o struktuře neznámých látek (Hirt, 2016).

Mezi výhody GC-MS patří vysoká citlivost, vysoká separační účinnost a vysoká specifita detektoru. Touto metodou nelze analyzovat tepelně labilní látky, další omezení je při analýze vysoce polárních látek (nutná např. derivatizace), nelze analyzovat vysokomolekulární sloučeniny a někdy je třeba provést předúpravu vzorku (Hirt, 2016).

Typický detektor, který se používá pro GC-MS je čtyřpólový hmotnostní spektrometr. Tento detektor se skládá ze čtyř rovnoběžných válcových tyčí (elektrod), které pomocí oscilujícího elektrického pole destabilizují či stabilizují dráhu nabitých molekul procházející polem kvadrupólu. Nabité molekuly, které projdou kvadrupólovým systémem, mají hodnoty poměru hmotnosti a náboje v určitém rozsahu. Tento rozsah je měněn podle změn napětí. Mezi další detektor, který lze použít patří detektor doby letu (TOF). Tento detektor využívá elektrické pole k urychlení iontů a vypočítá čas, za který dosáhne urychlený iont detektoru (Webster, 2021).

Metodou GC-MS lze získat rychlejší výsledky, proto se tato metoda používá v různých oblastech. GC-MS lze použít ve screeningových testech k detekci vrozených metabolických onemocnění, kdy se detekují stopové hladiny sloučenin např. v moči u pacientů s genetickými metabolickými poruchami. Techniku lze využít k monitorování znečišťujících látek v životním prostředí, tedy např. detekce herbicidů, pesticidů, fenolů a chlorofenolů ve vzduchu, půdě či vodě. Dále se používá k analýze potravin, k výzkumu vývoje a kontroly kvality ve farmaceutickém průmyslu, forenzní toxikologii k identifikaci jedů, detekci chemických bojových látek nebo i v geochemickém programu, kdy se analyzovala atmosféra planety Venuše a Marsu (Cheriyedath, 2019).

1.3.4.2 Plynová chromatografie s plameno-ionizačním detektorem

Nejvíce používaným detektorem v plynové chromatografii je plamenově-ionizační detektor (FID). Tento detektor je schopný detekovat v širokém rozmezí koncentrací skoro všechny organické látky. Princip metody GC-FID spočívá v měření změny elektrické vodivosti vodíkového plamene způsobené přítomností eluované organické látky (Zachař, 2019).

Detektor tvoří hořáček, do kterého na spodní části přívodem vstupuje nosný plyn vystupující z kolony, dále přídavný inertní plynu a vodík. Před vstupem do trysky hořáčku jsou všechny plyny smíseny. Do spodní části detektoru se přivádí vzduch, který slouží jako oxidant.

V detektoru jsou dále umístěny dvě elektrody, na které je vloženo konstantní stejnosměrné napětí. Vstupuje-li do plamene nosný plyn, vzniká v plameni nepatrné množství iontů, vodivost plamene je minimální a detektor zaznamenává pouze malý a konstantní proudový signál. Přichází-li do detektoru spolu s nosným plynem látka, která je spalitelná ve vodíkovém plameni, ionové fragmenty a elektrony vznikající při jejím hoření zvýší elektrickou vodivost plamene a tím dojde i ke zvýšení ionizačního proudu. Odezva detektoru je přímo úměrná koncentraci látky v nosném plynu, avšak závisí na struktuře stanovované látky (Zachař, 2019). Plamenově-ionizační detektor je destruktivní, protože celý vzorek je pyrolyzován. FID není ovlivněn nehořlavými plyny ani vodou, pokud není zhasnut plamen (Venton, 2021).

Metoda GC-FID se nejčastěji používá pro sledování kvality ovzduší, kdy se pomocí této metody sledují znečišťující látky v životním prostředí (Venton, 2021).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Seznam chemikálií a pomůcek

a) Deproteinační roztok

- Isopropylalkohol, p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 100%, hustota 780 kg/m^3, M = 60,10 g/mol, číslo šarže: PP/2017/02567
- Kyselina trihydrogenfosforečná, p. a. (PENTA s. r. o., Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, Praha, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 84 – 87%, hustota 1700 kg/m^3, M = 98 g/mol, číslo šarže: 1801230113
- *n*-heptan, čistý (Lach-Ner, s. r. o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR)
  - Balení 1000 ml, hustota 680 kg/m^3, M = 100,21 g/mol, číslo šarže: PP/2010/14672

b) Mobilní fáze pro TLC

- Diethylether, p. a., nestabilizovaný (PENTA s. r. o., Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 99,70%, hustota 714 kg/m^3, M = 74,12 g/mol, číslo šarže: 2611091121
- Kyselina octová, čistá (PENTA s. r. o., Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 99%, hustota 1050 kg/m^3, M = 60,05 g/mol, číslo šarže: 1907280714
- *n*-hexan, p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 99,43%, hustota 660 kg/m^3, M = 86,18 g/mol, číslo šarže: PP/2019/05665
- *n*-hexan, p. a. (PENTA s. r. o. Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 99%, hustota 659 kg/m^3, M = 86,18 g/mol, číslo šarže: 260308321

c) Chromatografické desky

- TLC Silica gel 60, 25 Glass plates 20x20 cm, balení 25 kusů, (Merck, Darmstadt, Německo)

d) Detekční činidlo

- 2‘,7‘-dichlorfluorescein (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)
  - Balení 100 ml, 90%, pro TLC, M = 401,2 g/mol, číslo šarže: 319108554

e) Vnitřní standard

- Kyselina *cis*-13, 16, 19 dokosatrienová (Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko)

f) Ostatní chemikálie

- Acetylchlorid, Reagent Plus > 98% (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Riedstr. 2 D-89555 Steinheim 49 7329 970 Německo)
  - Balení 500 ml, hustota 1104 kg/m^3, M = 78,50 g/mol, číslo šarže: STBK1935.
- Chloroform, p. a. (PENTA s. r. o., Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 99,80%, hustota 1477 kg/m^3, M = 119,38 g/mol, číslo šarže: 2204030417
- Methanol, p.a. (Lach-Ner, s. r. o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 99,98%, hustota 790 kg/m^3, M = 32,04 g/mol, číslo šarže: PP/2021/07806
  - Balení 1000 ml, obsah 99,98%, hustota 790 kg/m^3, M = 32,04 g/mol, číslo šarže: PP/2013/01048
- Toluen, p.a. (Lach-Ner, s. r. o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR)
  - Balení 1000 ml, obsah 100%, hustota 870 kg/m^3, M = 92,14 g/mol, číslo šarže: PP/2021/08282.
  - Balení 1000 ml, obsah 99,28%, hustota 870 kg/m^3, M = 92,14 g/mol, číslo šarže: PP/2013/02444.
- Uhličitan draselný, bezvodý (Lach-Ner, s. r. o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR)
  - Balení 1000 g, obsah 99,70 %, M = 138, 21 g/mol, číslo šarže: PP/2013/12622.

g) Tlakové láhve

- Dusík: N_2 4.0, UN 1066 (Linde Gas a.s., Praha, ČR)
- Helium: He 5.0, UN 1046 (Linde Gas a.s., Praha, ČR)
- Vodík: H_2 5.0 ≥ 99, 999 (Linde Gas a.s., Praha, ČR)
- Vzduch: O_2 20 %, N_2 80 %, UN 1956 (Linde Gas a.s., Praha, ČR)

h) Ostatní pomůcky

- Analytické váhy (Adventurer Pro OHAUS)
- Automatické pipety a sterilní špičky (Eppendorf Research plus)
- Centrifuga – malá multifunkční odstředivka MPW-56
- Destilovaná voda
- Chromatografická vana, odměrný válec
- Pasteurovy pipety
- Skleněné pipety a balónek
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem – Agilent 7890A a kolona HP-88
- Termobloky – PIERCE Reacti-Therm (18971), s odpařovacím a míchacím zařízením Thermo Scientific
- UV lampa
- Vialky, inserty a víčka
- Vortex – Heidolph Reax top, Labnet
- Vzorky ušního mazu, standard (pool plazma)

2.2 Postup

Vzorky ušních špuntů byly naváženy na analytických vahách a rozpuštěny v eppendorfkách v 500 ml roztoku toluen : methanol (poměr 4 : 1). Poté byly skladovány v mrazáku při -20 °C.

Denaturace bílkovin a extrakce lipidů

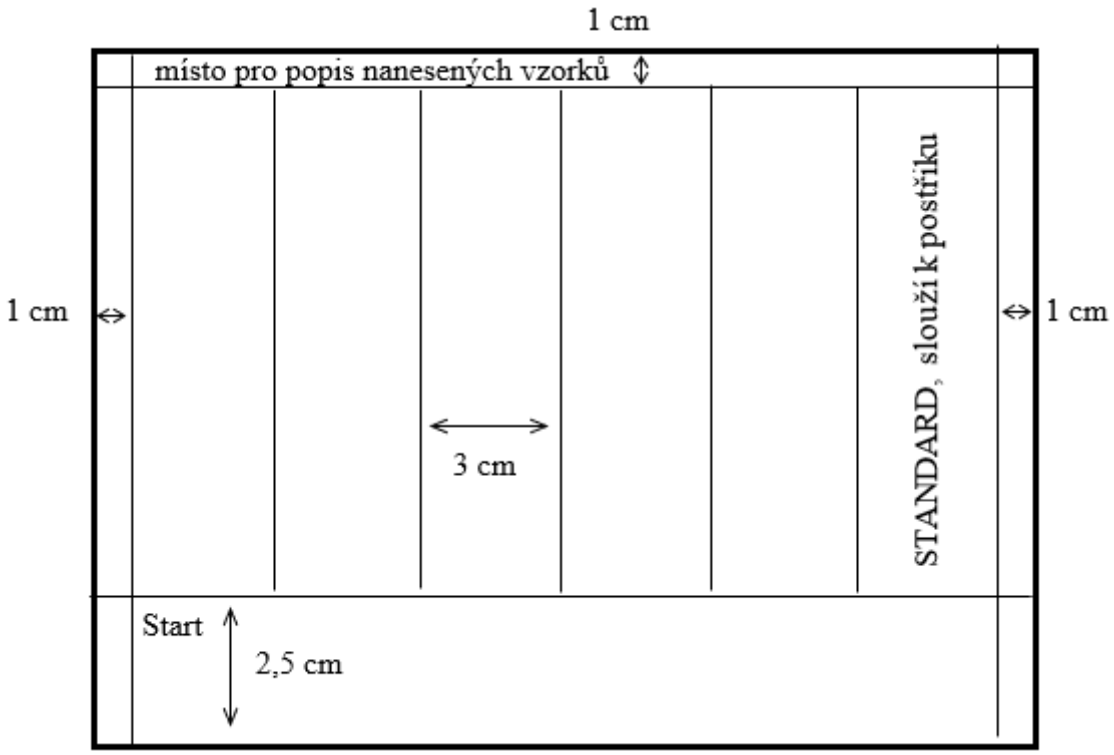
Po rozmrazení vzorků a standardu byl obsah promíchán na vortexu. Do pyrexových zkumavek s víčkem bylo napipetováno 500 µl vzorku ušního mazu nebo standardu (plazma). Poté bylo přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku (propanol, *n*-heptan, kyselina fosforečná 40 : 20 : 1) a směs byla promíchána na vortexu a po dobu 10 minut byla kondiciována při pokojové teplotě. Ke směsi ve zkumavce byl přidán 1 ml interního standardu pro plynovou chromatografii

o *c* = 10 μg/ml a 1,5 ml destilované vody. Nově vzniklá směs byla opět promíchána na vortexu. Poté byla směs centrifugována 10 minut při 3000 ot/min.

Horní (organická) vrstva byla přepipetována do čisté kónické zkumavky a odpařena pod dusíkem při laboratorní teplotě v digestoři do sucha.

Příprava chromatografické desky

Na chromatografickou desku byly měkkou tužkou vyznačeny jednotlivé dráhy, čelo a start (viz Obrázek 7). Start byl označen 2,5 cm od spodního okraje desky, čelo bylo 1 cm od horního okraje desky. Po stranách byly označeny 1 cm široké okraje. Zbylá plocha desky byla rozdělena do 6 drah o šířce 3 cm. V horní části desky byly popsány nanesené vzorky.



Obrázek 7 – Chromatografická deska

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla vytvořena smícháním 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml 98% kyseliny octové. Směs byla přelita do chromatografické vany a nechala se 30 – 40 minut sytit před vložením chromatografické desky.

Vlastní chromatografie

K odparku bylo přidáno 75 µl směsi chloroform : methanol (poměr 2 : 1). Skleněnými Pasteurovými pipetami byl celý objem 5 vzorků a 1 standardu přenesen na startovní čáru chromatografické desky. Při nanášení se dbalo na neporušení povrchu desky a na správné nanesení, aby se vzorky nedotýkaly ohraničených drah. Jeden vzorek je zpravidla nanášen v 6-ti vrstvách a vždy se dbalo zaschnutí nanesené vrstvy.

Po nanesení celého objemu byly zkumavky vypláchnuty 25 µl směsi chloroform : methanol (poměr 2 : 1) a nanášení vzorku bylo opakováno.

Po zaschnutí vrstev byla deska vložena do vany, dokud nedošla mobilní fáze do pozice startovní linie. Poté byla deska vyjmuta z vany a ponechána na vzduchu na zaschnutí (zakoncentrování). Po zaschnutí byla deska vrácena do nasycené chromatografické vany a nechala se vyvíjet, dokud vzlínající mobilní fáze nedosáhla hranice čela. Celá chromatografie probíhala ve vaně, která byla přikryta krabicí a trvala cca 1 hodinu.

Poté byla deska vyjmuta z vany a vysušena v digestoři. Na chromatografické desce nejsou patrné rozdělené lipidy. Na desce je zřetelně vidět pouze cholesterol. Lipidy se však rozdělily do 5 tříd – PL, DG, FFA, TAG a EC.

Detekce rozdělených vrstev

K detekci rozdělených lipidů byl použit 2,7 – dichlorfluorescein, který byl na chromatografickou desku v oblasti standardů rovnoměrně rozprášen. Zbylá část desky byla zakryta starší chromatografickou deskou. Pro vizualizaci rozdělených lipidových frakcí byla použita UV lampa.

Izolace jednotlivých složek lipidů

Jedna deska – 25 pyrexových zkumavek bylo popsáno, opatřeno uzávěrem s teflonovým těsněním a teflonovým mikromíchadlem. Dle rozdělených tříd lipid v oblasti standardu byly měkkou tužkou označeny jednotlivé složky lipidů tak, že nad i pod okrajem skvrny zbývá cca 0,5 cm. Získaná pole (kromě cholesterolu) se vyškrábou do příslušných pyrexových zkumavek s uzávěrem s teflonovým těsněním.

Derivatizace: převedení na methylestery

Ke všem vyškrábaným frakcím lipidů v pyrexových zkumavkách byl přidán 1 ml směsi toluen : methanol (poměr 4 : 1) a ke všem frakcím kromě frakce FFA ještě 1 ml roztoku interního standardu pro plynovou chromatografii o $c = 10$ μg/ml.

Termobloky byly vyhřáty na 100 °C a míchadlo bylo nastaveno na hodnotu 8. Do zkumavek bylo napipetováno 200 μl acetylchloridu, který slouží jako katalyzátor esterifikace. Zkumavky byly uzavřeny víčkem s teflonovým těsněním a 1 hodinu probíhala esterifikační reakce.

Po 1 hodině esterifikace byly zkumavky stáním zchlazeny na laboratorní teplotu. Poté byla provedena neutralizace 5 ml 6% K_2CO_3. Po přidání 6% K_2CO_3 byla směs v ruce intenzivně 2 minuty třepána a poté 10 minut centrifugována při 3000 ot/min. Horní organická fáze byla odpipetována do čistých a popsaných zkumavek. Organická fáze byla odpařena pod dusíkem v digestoři do sucha. Do odpařených zkumavek bylo přidáno 100 μl směsi toluen : methanol (poměr 4 : 1), roztok byl promíchán na vortexu a přepipetován do připravených chromatografických vialek s insertem. Chromatografické vialky byly uzavřeny víčkem s pryžovým septem a vloženy do mrazáku.

Vlastní plynová chromatografie

Chromatografické vialky se vzorky byly vloženy do karuselu. Po naprogramování dané sady vzorků se spustil plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A.

Teplotní program na koloně je: počáteční teplota 130 °C po dobu 1 minuty, následuje teplotní gradient: o 2 °C za minutu do 176 °C po dobu 2 minut, dále o 1 °C za minutu do 186 °C po dobu 1 minuty, následně o 0,2 °C za minutu do 190 °C po dobu 1 minuty a na závěr o 1 °C za minutu do 220 °C po dobu 4 minut

Celý čas analýzy jednoho vzorku je 92 minut (pro EC 120 minut), měří se v módu split v poměru 10 : 1.

Vyhodnocení výsledků

Pro identifikaci jednotlivých píků mastných kyselin se používaly eluční časy získané pomocí měření jednotlivých roztoků mastných kyselin. Veškeré analýzy se prováděly s použitím vnitřního standardu. Všechny získané chromatogramy se integrovaly v programu

GC ChemStation B04.03 a takto získaná data se dále statisticky zpracovávaly pomocí softwaru MS Excel 2007 a Statistica 12.

Měření na GC-FID

Připravené vzorky v uzavřených vialkách byly naskládány do karuselu (max. 15 vzorků). Poté následovala kontrola jehly – její správné připevnění, zda není ohnutá a kontrola pístu, který by měl jít hladce (pokud ne, nutné vyčištění pomocí 2-propanolu). Následovalo puštění plynu. Na ventilu byly 2 budíky, kdy první ukazuje množství plynu v lahvi a druhým budíkem lze nastavit tlak. Pro naše měření byl použit tlak 6 – 7 bar. Nyní byl zapnut GC-FID bílým tlačítkem vlevo dole. Šedé tlačítko umístěné vpravo dole je určeno k otevírání do prostoru kolony. Pomocí tlačítka STATUS se lze přepnout do modulu, který ukazuje, co se děje v GC-FID, teploty, kolik procent daného vzorku je již změřeno.

Druhá kontrola spočívá v umístění vialek nebo kontrole pozic v karuselu. V pozici A je do 2/3 naplněná vialka propanolem (n-propylalkoholem), v pozici W je umístěna prázdná vialka pro odpad, v pozici 116 je umístěna do 2/3 naplněná vialka hexanem, pozice B musí zůstat prázdná.

Nastavení sekvence (měření vzorků)

Nastavení se provádí v programu **Instrument 1 online**. Dle manuálu byl nastaven program: modul Methods and run control → Sequence → Sequence Parameters → do pole Subdirector název sekvence → okno s vytvořením složky → yes → ok

Sequence → Sequence Table → nastavení tabulky → ok

Jako první je měřen hexan, který slouží k promytí kolony a dává se vždy po každých pěti vzorcích. Hexan se dává jako poslední vzorek v metodě Standby. Po sobě dáváme měřit stejné frakce vzorků, nejlépe měření v jedné sekvenci. Pokud to nelze je nutné kolonu mezi frakcemi promýt hexanem.

Pro měření frakcí PL, DG, FFS, TAG lze použít metodu MK_222, pro měření EC MK_222CE a pro hexan CEGAN_2.

Sequence → Save Sequence Template As → File Name: shodné se Subdirector + .S → ok
Run Control → Run Sequence

Zastavení měření se provádí: Run Control → Stop Run/Inject/Sequence

Vyhodnocování vzorků

Nastavení se provádí v programu **Instrument 1 offline**. Vyhodnocování probíhá v Modu Data Analysis. Poté se vlevo vybere složka, která se bude vyhodnocovat. Dále se pokračovalo dle návodu.

Statistické vyhodnocení vzorků

Ke statistickému vyhodnocení byl použit program STATISTICA 12 (StatSoft ČR s. r. o., Česká republika). V programu bylo analyzováno 71 vzorků ušního mazu, které byly rozděleny do skupin dle věku. V tabulce byly ve sloupcích mastné kyseliny (40) a v řádcích vzorky pacientů. Za mastnými kyselinami byly dále ve sloupcích enzymy (9-desaturáza, 5-desaturáza, 9-desaturáza x 100, elongáza x 100, 6-desaturáza x 100 a *de novo* lipogeneze).

Z bodového grafu závislosti enzymů na mastné kyselině bylo podle hodnoty *p*, což je nejnižší hladina významnosti. Protože byl použit 95 % interval měla hladina významnosti α hodnotu 0,05. S touto hodnotou byla porovnávána hodnota *p*. Pokud byla hodnota *p* menší než 0,05, byla přijata hypotéza, že mastná kyselina je klinicky významná (viz Tabulka 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20). Tabulka 6, 9, 12, 15, 18 obsahuje průměrné hodnoty a STD pro určité frakce a skupiny.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Směrodatná odchylka (*STD* [µmol/l]) a variační koeficient (*CV* [%]) byly vypočítány podle vzorců (1) a (2)

$$STD = \sqrt{\frac{\sum(c_i - \bar{c})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

$$CV = \frac{STD}{\bar{c}} \cdot 100, \quad (2)$$

kde n je počet měření, $\bar{c}$ [µmol/l] je průměrná koncentrace a c_i [µmol/l] koncentrace pro určité měření.

Tabulka 3 – Přehled analyzovaných vzorků ušního mazu.

pohlaví	počet
Ž	35
M	36

věk	počet	pohlaví MxŽ	typ SxM
do 30	8	4x4	3x5
(31-60)	22	10x12	5x17
60+	41	22x19	18x23

věk	počet	pohlaví MxŽ	typ SxM
61-70	17	11x6	5x12
71+	24	11x13	13x11

Přesnost – K měření přesnosti byla použita plazma a výsledky pro jednotlivé frakce jsou shrnuty v Tabulce 4 a 5.

Tabulka 4 – Přesnost metody pro frakce PL, DG.

		PL			DG		
kyselina	**vzorec**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	**CV [%]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	**CV [%]**
12-methyltridekanová	12M-C13:0	2,05	0,03	1,5	1,51	0,03	2,3
myristová	C14:0	10,06	0,12	1,2	2,78	0,08	3,0
13-methylmyristová	13M-C14:0	0,89	0,04	4,5	0,27	0,01	5,3
12-methyltetradekanová	12M-C14:0	2,19	0,04	1,8	0,79	0,04	4,9
pentadekanová	C15:0	6,67	0,12	1,8	1,29	0,06	4,7
palmitová	C16:0	577,95	1,80	0,3	54,52	1,71	3,1
*trans*palmitoolejová	9-C16:1-*trans*	0,30	0,01	3,6	0,16	0,01	5,0
sapienová	C16:1-N10	9,44	0,08	0,8	2,59	0,09	3,4
cis palmitoolejová	9-C16:1-*cis*	3,18	0,01	0,3	0,89	0,04	4,3
14-methylhexadekanová	14M-C16:0	2,59	0,06	2,1	1,41	0,05	3,8
heptadekanová	C17:0	1,18	0,03	2,2	0,50	0,02	4,1
16-methylheptadekanová	16M-C17:0	1,05	0,05	4,3	0,77	0,04	5,3
stearová	C18:0	217,00	1,94	0,9	32,49	0,58	1,8
trans vacenová	C18:1-N7-*trans*	5,63	0,02	0,4	0,95	0,04	4,6
olejová	C18:1-N9	94,50	0,19	0,2	13,76	0,26	1,9
vacenová	C18:1-N7-*cis*	14,27	0,05	0,3	1,86	0,10	5,4
nonadekanová	C19:0	4,24	0,02	0,6	2,07	0,08	3,9
linolová	C18:2-N6	184,02	0,58	0,3	10,10	0,16	1,6
gama-linolenová	C18:3-N6	1,33	0,01	0,8	0,57	0,03	4,5
arachidová	C20:0	2,86	0,02	0,7	1,50	0,06	4,0
alpha-linolenová	C18:3-N3	1,70	0,02	1,2	0,74	0,03	4,3
oktadekadienová	C18:2-9Z, 11E	5,50	0,04	0,7	1,54	0,06	4,1
oktadekadienová	C18:2-10Z, 12Z	16,35	0,06	0,4	3,73	0,12	3,3
stearidová	C18:4-N3	1,87	0,04	2,2	1,61	0,07	4,1
cis 8,11,14-eikosatrienová	C20:3-N6	3,72	0,05	1,3	0,58	0,02	2,7
behenová	C22:0	4,15	0,05	1,1	0,76	0,04	5,0
arachidonová	C20:4-N6	0,84	0,02	2,4	3,20	0,05	1,7
eikosatetraenová	C20:4-N3	1,20	0,03	2,2	0,52	0,02	3,7
eikosapentaenová	C20:5-N3	14,54	0,07	0,5	9,09	0,43	4,8
lignocerová	C24:0	15,90	0,07	0,4	1,59	0,08	5,2
dokosatetraenová	C22:4-N6	2,14	0,02	1,0	1,21	0,06	4,8
nervová	C24:1-N9	159,16	0,55	0,3	2,94	0,13	4,3
dokosapentaenová	C22:5-N6	1,48	0,06	3,9	0,53	0,02	4,0
dokosapentaenová	C22:5-N3	0,85	0,02	2,7	0,22	0,01	4,1
dokosahexaenová	C22:6-N3	0,33	0,02	4,7	0,44	0,02	4,8
cerotová	C26:0	1,54	0,06	3,7	0,69	0,03	5,0
tetrakosatetraenová	C24:4-N6	2,33	0,03	1,3	0,79	0,03	4,4
tetrakosapentaenová	C24:5-N6	0,93	0,01	1,2	0,76	0,03	4,3
tetrakosapentaenová	C24:5-N3	2,58	0,10	3,9	1,67	0,07	4,1
tetrakosahexaenová	C24:6-N3	10,05	0,10	1,0	0,64	0,03	4,1

Tabulka 5 – Přesnost metody pro frakce FFA, TAG, EC.

	FFA			TAG			EC		
kyselina	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	**CV [%]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	**CV [%]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	**CV [%]**
12-methyltridekanová	2,12	0,05	2,4	0,81	0,04	5,2	0,25	0,01	4,8
myristová	14,93	0,79	5,3	15,45	0,29	1,9	6,84	0,31	4,5
13-methylmyristová	4,96	0,26	5,3	0,62	0,03	4,1	17,07	0,34	2,0
12-methyltetradekanová	4,53	0,20	4,4	1,84	0,06	3,3	0,18	0,01	4,7
pentadekanová	10,33	0,20	2,0	4,41	0,06	1,4	2,57	0,08	3,3
palmitová	176,27	0,99	0,6	195,79	1,55	0,8	138,52	1,37	1,0
*trans*palmitoolejová	1,57	0,04	2,3	0,29	0,01	3,9	3,80	0,13	3,5
sapienová	18,36	1,26	6,9	6,77	0,03	0,5	16,89	0,43	2,5
cis palmitoolejová	6,86	0,38	5,5	7,70	0,18	2,4	3,01	0,09	3,0
14-methylhexadekanová	2,26	0,09	3,8	2,35	0,05	2,3	1,04	0,03	2,7
heptadekanová	0,99	0,04	4,4	0,55	0,03	5,1	1,08	0,04	3,7
16-methylheptadekanová	2,13	0,10	4,5	1,42	0,06	4,2	0,98	0,04	4,1
stearová	52,36	1,62	3,1	38,62	0,30	0,8	1,42	0,07	5,1
trans vacenová	2,20	0,12	5,5	1,60	0,03	1,9	164,59	0,50	0,3
olejová	144,09	3,32	2,3	165,89	6,27	3,8	7,71	0,19	2,5
vacenová	7,50	0,35	4,7	8,09	0,13	1,5	2,92	0,10	3,5
nonadekanová	5,86	0,27	4,7	2,64	0,04	1,5	224,93	0,72	0,3
linolová	50,92	2,32	4,6	73,70	1,54	2,1	2,58	0,04	1,7
gama-linolenová	0,36	0,02	4,9	0,42	0,02	5,4	1,06	0,06	5,3
arachidová	1,32	0,07	5,1	2,18	0,11	5,0	2,04	0,07	3,5
alpha-linolenová	0,79	0,01	1,5	0,80	0,03	4,1	0,38	0,02	5,5
oktadekadienová	10,97	0,39	3,6	11,96	0,09	0,7	1,07	0,04	3,7
oktadekadienová	8,19	0,40	4,9	6,62	0,19	2,9	3,92	0,10	2,4
stearidová	1,85	0,06	3,4	8,52	0,10	1,1	0,42	0,02	4,9
cis 8,11,14-eikosatrienová	0,93	0,04	4,1	0,71	0,03	4,5	0,87	0,02	2,3
behenová	2,48	0,09	3,8	1,32	0,06	4,6	24,04	0,39	1,6
arachidonová	6,25	0,17	2,7	0,52	0,02	4,1	0,26	0,01	5,0
eikosatetraenová	7,24	0,33	4,5	1,48	0,03	2,3	0,29	0,00	0,9
eikosapentaenová	16,86	0,92	5,5	19,83	0,41	2,1	2,50	0,12	4,7
lignocerová	5,26	0,05	0,9	4,07	0,02	0,5	0,90	0,02	2,6
dokosatetraenová	1,24	0,06	4,5	2,01	0,03	1,5	0,47	0,01	2,9
nervová	13,15	0,51	3,9	5,97	0,17	2,8	2,49	0,09	3,8
dokosapentaenová	0,30	0,01	4,0	5,55	0,04	0,7	3,47	0,02	0,7
dokosapentaenová	1,58	0,05	3,2	0,30	0,01	3,0	0,06	0,00	4,9
dokosahexaenová	3,81	0,08	2,2	2,24	0,05	2,2	0,33	0,01	4,1
cerotová	2,98	0,15	4,9	5,50	0,11	2,0	8,27	0,24	2,9
tetrakosatetraenová	2,17	0,07	3,1	0,26	0,01	4,4	54,81	0,21	0,4
tetrakosapentaenová	0,50	0,02	4,9	0,22	0,01	3,8	1,44	0,07	4,5
tetrakosapentaenová	1,35	0,06	4,7	1,23	0,05	4,5	0,17	0,01	3,5
tetrakosahexaenová	2,51	0,12	4,8	2,94	0,13	4,5	2,17	0,11	4,9

Tabulka 6 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu pro určité věkové skupiny ve frakci PL.

frakce PL								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71+**	
kyselina	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**
12-methyltridekanová	1,35	0,93	2,08	0,73	1,22	0,21	1,34	0,38
myristová	8,49	0,34	9,72	2,50	17,58	2,97	10,87	2,58
13-methylmyristová	1,23	0,21	1,55	0,48	1,13	0,23	1,37	0,58
12-methyltetradekanová	1,25	0,44	1,95	0,36	4,88	0,77	1,57	0,55
pentadekanová	3,08	0,86	3,76	0,58	8,47	1,32	3,96	1,64
palmitová	152,93	22,51	223,31	36,96	159,93	26,36	101,85	43,61
*trans*palmitoolejová	0,34	0,10	0,52	0,14	0,93	0,16	0,60	0,40
sapienová	6,13	1,56	8,40	1,58	6,05	1,59	4,78	1,79
cis palmitoolejová	1,33	0,57	1,93	0,75	2,79	0,65	1,39	0,48
14-methylhexadekanová	1,63	0,24	1,78	0,59	2,67	0,52	1,65	0,74
heptadekanová	0,75	0,26	0,77	0,23	2,97	0,54	1,09	0,43
16-methylheptadekanová	1,14	0,43	1,12	0,67	1,37	0,39	1,34	0,37
stearová	125,75	19,88	122,83	25,93	123,17	26,83	55,92	25,88
trans vacenová	1,78	0,43	2,03	0,67	1,39	0,45	1,51	0,49
olejová	48,74	35,11	8,39	3,17	6,59	1,52	6,51	2,19
vacenová	2,07	0,73	6,70	3,59	5,85	1,77	2,24	1,18
nonadekanová	3,69	0,81	3,15	0,76	2,79	0,71	2,61	1,03
linolová	23,34	7,08	23,55	6,55	22,36	3,98	26,38	8,92
gama-linolenová	0,88	0,20	0,97	0,35	0,80	0,39	0,86	0,26
arachidová	2,64	0,53	1,47	0,43	3,15	0,70	1,82	0,67
alpha-linolenová	1,46	0,32	1,12	0,24	1,07	0,27	1,25	0,42
oktadekadienová	3,96	2,07	3,55	0,87	1,42	0,38	4,03	1,06
oktadekadienová	17,65	10,45	3,54	0,76	2,49	0,55	5,43	2,85
stearidová	2,66	0,42	1,89	0,61	3,36	0,62	3,80	1,43
cis 8,11,14-eikosatrienová	0,80	0,32	1,04	0,17	0,96	0,22	0,84	0,33
behenová	2,15	0,50	1,35	0,28	1,71	0,48	1,61	0,62
arachidonová	1,79	0,42	0,91	0,37	1,48	0,34	1,76	2,00
eikosatetraenová	3,29	0,43	2,39	0,75	2,09	0,39	1,78	0,51
eikosapentaenová	40,45	2,63	46,62	4,65	63,81	7,58	55,07	15,93
lignocerová	21,45	6,16	33,02	5,13	41,10	6,67	24,20	5,80
dokosatetraenová	7,79	3,26	3,25	0,75	6,94	1,03	4,50	2,12
nervová	34,14	31,19	41,72	9,79	4,53	1,02	27,70	12,91
dokosapentaenová	2,07	0,95	1,50	0,34	1,41	0,45	2,99	1,66
dokosapentaenová	1,45	0,36	0,78	0,30	0,78	0,19	1,90	1,63
dokosahexaenová	1,09	0,51	1,22	0,27	1,50	0,56	2,42	1,35
cerotová	20,41	3,27	27,52	4,80	43,90	5,72	24,48	5,40
tetrakosatetraenová	1,00	0,35	0,72	0,23	1,53	0,43	1,02	0,34
tetrakosapentaenová	2,58	1,13	1,16	0,32	1,38	0,32	5,72	1,98
tetrakosapentaenová	1,69	0,25	1,60	0,40	2,19	0,58	1,80	0,61
tetrakosahexaenová	19,76	2,92	20,18	2,64	34,58	3,92	20,26	3,89
9-desaturáza	0,42	0,33	0,08	0,04	0,06	0,02	0,13	0,06
9-desaturáza x 100	0,86	0,30	0,90	0,41	1,79	0,50	1,57	0,77
elongáza x 100	84,12	19,73	55,23	8,89	78,92	20,25	58,01	24,65
5-desaturáza	2,54	1,12	0,90	0,40	1,63	0,60	2,09	1,62
6-desaturáza x 100	3,66	1,73	4,70	1,43	4,42	1,13	3,61	1,71
de novo lipogeneze	6,93	1,52	9,98	2,41	7,53	2,56	4,32	2,36

Ve frakci PL převládaly z nasycených mastných kyselin – kyselina palmitová (0 – 30 let: c = 152,93 ± 22,51 μmol/l, 31 – 60 let: c = 223,31 ± 36,96 μmol/l, 61 – 70 let: c = 159,93 ± 26,36 μmol/l, 71 +: c = 101,85 ± 43,61 μmol/l) a kyselina stearová (0 – 30 let: c = 125,75 ± 19,88 μmol/l, 31 – 60 let: c = 122,83 ± 25,93 μmol/l, 61 – 70 let: c = 123,17 ± 26,83 μmol/l, 71 +: c = 55,92 ± 25,88 μmol/l).

V rámci hodnocení 40 mastných kyselin bylo hodnoceno i 4 MK s lichým počtem uhlíků (13-methylmyristová, pentadekanová, heptadekanová a nonadekanová). Z lichých mastných kyselin převládaly – kyselina pentadekanová (0 – 30 let: c = 3,08 ± 0,86 μmol/l, 31 – 60 let: c = 3,76 ± 0,58 μmol/l, 61 – 70 let: c = 8,47 ± 1,32 μmol/l, 71 +: c = 3,96 ± 1,64 μmol/l) a kyselina nonadekanová (0 – 30 let: c = 3,69 ± 0,81 μmol/l, 31 – 60 let: c = 3,15 ± 0,76 μmol/l, 61 – 70 let: c = 2,79 ± 0,71 μmol/l, 71 +: c = 2,61 ± 1,03 μmol/l).

Rozdělení věkových skupin u analýzy vzorků ušního mazu:

- I (0 – 30 let), II (31 – 60 let), III (61 – 70 let), IV (71 +).

Klinicky významné kyseliny jsou vyznačeny barevně.

Tabulka 7 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce PL.

	9-desaturáza				9-desaturáza x 100				elongáza x 100			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 8 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce PL – pokračování.

	5-desaturáza				6-desaturáza x 100				*de novo* lipogeneze			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 9 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu pro určité věkové skupiny ve frakci DG.

frakce DG								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71+**	
kyselina	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**
12-methyltridekanová	1,14	0,59	1,43	0,31	1,56	0,36	1,51	0,42
myristová	4,74	0,75	5,39	1,09	7,10	1,14	5,35	1,58
13-methylmyristová	2,16	2,05	1,32	1,16	1,02	0,15	0,49	0,28
12-methyltetradekanová	2,97	0,56	2,41	0,46	3,02	0,83	2,18	0,94
pentadekanová	3,21	2,33	3,38	0,63	5,93	1,70	1,83	0,59
palmitová	136,21	11,78	122,13	19,74	121,39	11,87	85,28	37,70
*trans*palmitoolejová	0,39	0,09	0,42	0,14	0,49	0,10	0,30	0,15
sapienová	6,22	2,07	7,02	3,08	14,95	2,97	4,57	1,99
cis palmitoolejová	1,33	0,29	0,66	0,22	1,29	0,36	1,64	1,16
14-methylhexadekanová	2,19	0,19	1,33	0,33	1,12	0,35	1,36	0,65
heptadekanová	0,95	0,25	0,77	0,95	0,78	0,23	0,73	0,34
16-methylheptadekanová	0,89	0,21	1,00	0,24	1,14	0,45	0,88	0,32
stearová	90,49	6,12	63,09	9,01	64,31	9,34	63,65	32,25
trans vacenová	1,11	0,27	0,53	0,17	0,93	0,20	0,71	0,40
olejová	21,41	6,01	12,60	2,51	6,98	1,16	5,28	1,99
vacenová	4,82	1,34	3,09	0,96	3,41	1,14	1,85	1,14
nonadekanová	3,78	0,68	4,67	3,19	2,53	0,46	3,03	1,07
linolová	10,75	5,03	6,01	1,89	3,44	0,72	5,07	1,70
gama-linolenová	0,86	0,20	1,00	0,43	3,94	1,18	1,44	0,74
arachidová	2,91	0,50	1,63	0,34	1,18	0,34	1,68	1,04
alpha-linolenová	1,71	0,36	1,44	0,31	2,24	0,60	1,59	0,51
oktadekadienová	3,43	1,41	2,66	0,66	2,35	0,63	2,36	1,82
oktadekadienová	6,93	1,02	7,85	1,17	6,47	0,75	6,49	2,31
stearidová	3,32	1,07	1,70	0,47	1,89	0,57	2,18	1,20
cis 8,11,14-eikosatrienová	0,68	0,33	0,58	0,22	0,53	0,13	0,68	0,76
behenová	0,74	0,23	1,00	0,22	0,84	0,21	0,85	0,29
arachidonová	1,28	1,10	2,41	0,59	1,71	0,64	2,29	0,67
eikosatetraenová	2,24	0,99	1,98	2,80	0,91	0,16	1,06	0,57
eikosapentaenová	20,48	2,43	15,49	2,58	18,06	2,22	13,22	3,46
lignocerová	6,12	3,28	6,87	1,09	7,48	1,40	5,95	2,12
dokosatetraenová	4,13	0,86	1,68	0,38	1,10	0,30	1,52	0,63
nervová	3,19	0,81	1,17	0,30	2,03	2,89	1,90	1,14
dokosapentaenová	0,95	0,48	0,43	0,19	0,74	0,17	0,68	0,28
dokosapentaenová	0,65	0,32	0,31	0,12	0,92	0,28	0,53	0,20
dokosahexaenová	0,63	0,15	0,57	0,42	0,55	0,11	0,62	0,34
cerotová	4,14	0,95	5,67	1,25	7,13	1,25	5,34	1,43
tetrakosatetraenová	0,62	0,15	0,61	0,23	0,65	0,16	0,60	0,29
tetrakosapentaenová	1,07	0,38	0,58	0,19	1,23	0,26	1,28	0,32
tetrakosapentaenová	1,98	0,49	1,53	0,39	1,66	0,37	1,54	0,35
tetrakosahexaenová	2,62	0,71	3,23	0,61	2,70	0,48	3,07	0,81
9-desaturáza	0,24	0,08	0,20	0,05	0,11	0,02	0,10	0,07
9-desaturáza x 100	0,97	0,17	0,54	0,17	1,07	0,32	2,65	2,55
elongáza x 100	66,95	9,03	52,35	7,13	53,09	6,89	75,16	19,85
5-desaturáza	1,56	0,85	4,79	2,13	3,47	1,77	4,76	2,20
6-desaturáza x 100	9,07	6,86	10,42	5,58	16,56	6,59	13,96	13,10
de novo lipogeneze	15,58	6,44	22,11	7,47	36,92	9,49	17,28	5,88

Ve frakci DG převládaly z nasycených mastných kyselin – kyselina palmitová (0 – 30 let: c = 136,21 ± 11,78 μmol/l, 31 – 60 let: c = 122,13 ± 19,74 μmol/l, 61 – 70 let: c = 121,39 ± 11,87 μmol/l, 71 +: c = 85,25 ± 37,70 μmol/l) a kyselina stearová (0 – 30 let: c = 90,49 ± 6,12 μmol/l, 31 – 60 let: c = 63,09 ± 9,01 μmol/l, 61 – 70 let: c = 64,31 ± 9,34 μmol/l, 71 +: c = 63,65 ± 32,25 μmol/l).

Z lichých mastných kyselin převládaly – kyselina pentadekanová (0 – 30 let: c = 3,21 ± 2,33 μmol/l, 31 – 60 let: c = 3,38 ± 0,63 μmol/l, 61 – 70 let: c = 5,93 ± 1,70 μmol/l, 71 +: c = 1,83 ± 0,59 μmol/l) a kyselina nonadekanová (0 – 30 let: c = 3,78 ± 0,68 μmol/l, 31 – 60 let: c = 4,67 ± 3,19 μmol/l, 61 – 70 let: c = 2,53 ± 0,46 μmol/l, 71 +: c = 3,03 ± 1,07 μmol/l).

Tabulka 10 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce DG.

	9-desaturáza				9-desaturáza x 100				elongáza x 100			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 11 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce DG – pokračování.

	5-desaturáza				6-desaturáza x 100				*de novo* lipogeneze			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 12 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu pro určité věkové skupiny ve frakci FFA.

frakce FFA								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71+**	
kyselina	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**
12-methyltridekanová	1,22	0,44	2,85	0,65	1,56	0,27	1,62	0,65
myristová	47,82	48,57	7,28	2,68	137,57	22,09	12,33	4,53
13-methylmyristová	2,14	2,03	1,36	0,64	19,10	4,69	1,71	0,81
12-methyltetradekanová	1,93	0,81	2,85	0,75	3,43	0,77	3,79	2,40
pentadekanová	30,75	31,03	5,28	1,40	126,60	33,15	11,97	7,67
palmitová	381,09	356,05	213,35	44,22	666,08	88,67	114,52	48,87
*trans*palmitoolejová	1,01	0,69	1,53	0,39	1,76	0,54	1,36	0,88
sapienová	27,34	13,89	24,25	21,24	24,57	4,84	30,74	23,75
cis palmitoolejová	4,12	3,07	2,35	1,04	2,30	0,81	1,69	1,05
14-methylhexadekanová	8,74	2,96	2,97	0,91	6,29	3,08	3,82	2,62
heptadekanová	0,95	0,37	1,07	0,32	2,40	0,46	1,68	1,33
16-methylheptadekanová	1,71	0,68	1,37	0,31	4,31	1,25	1,27	0,54
stearová	87,54	62,12	62,84	10,80	121,46	21,18	45,25	18,50
trans vacenová	2,50	0,53	1,80	0,49	1,54	0,45	1,48	1,37
olejová	111,51	98,47	18,18	14,45	124,47	19,10	26,45	14,52
vacenová	8,01	3,61	16,37	4,19	28,48	3,94	11,19	6,77
nonadekanová	6,24	4,42	5,01	1,23	5,04	1,48	4,89	2,38
linolová	36,58	38,75	20,91	3,11	39,78	6,62	25,80	16,58
gama-linolenová	0,60	0,26	1,10	0,38	2,24	0,49	0,96	0,27
arachidová	1,92	0,95	5,82	1,60	6,73	1,27	2,39	1,29
alpha-linolenová	2,10	0,56	1,60	0,36	2,43	0,38	1,08	0,51
oktadekadienová	5,02	1,05	3,87	1,30	24,84	6,18	11,34	11,15
oktadekadienová	13,48	1,57	10,22	4,54	26,47	2,99	20,38	15,44
stearidová	3,31	2,00	4,72	1,57	6,16	1,01	12,84	16,40
cis 8,11,14-eikosatrienová	0,94	0,47	1,20	0,31	3,00	0,57	1,45	0,73
behenová	2,45	1,21	2,42	0,93	3,19	0,57	3,16	1,76
arachidonová	1,87	1,25	4,32	1,19	7,60	1,54	3,34	1,56
eikosatetraenová	4,92	1,51	2,00	0,59	5,34	0,86	1,73	0,78
eikosapentaenová	73,89	18,25	112,79	29,97	36,23	14,10	64,88	24,99
lignocerová	37,47	9,44	19,64	3,79	24,81	4,94	7,90	3,05
dokosatetraenová	3,05	0,47	2,53	0,94	3,35	0,60	2,50	1,34
nervová	9,14	2,00	4,92	1,53	10,42	1,59	6,47	5,33
dokosapentaenová	0,95	0,55	2,40	0,74	1,99	0,71	3,76	6,43
dokosapentaenová	0,39	0,43	0,63	0,21	1,00	0,31	0,50	0,22
dokosahexaenová	0,60	0,23	1,13	0,35	1,93	0,32	0,92	0,39
cerotová	21,89	7,05	16,66	2,64	19,36	5,65	12,67	6,61
tetrakosatetraenová	0,97	0,38	1,26	0,53	2,23	0,49	0,85	0,45
tetrakosapentaenová	0,81	0,23	1,25	0,36	2,11	0,73	1,63	1,20
tetrakosapentaenová	1,88	0,50	2,33	0,39	2,04	0,41	1,36	0,64
tetrakosahexaenová	7,32	6,77	24,54	2,47	22,48	3,40	20,08	5,81
9-desaturáza	1,08	0,40	0,31	0,30	1,06	0,26	0,67	0,43
9-desaturáza x 100	1,85	0,97	1,14	0,55	0,35	0,12	1,69	1,45
elongáza x 100	41,56	22,83	30,92	9,14	18,47	3,73	43,25	19,57
5-desaturáza	1,90	0,83	3,79	1,31	2,61	0,69	2,72	1,45
6-desaturáza x 100	48,45	55,94	5,99	2,42	7,64	1,46	8,24	6,04
de novo lipogeneze	44,58	40,00	10,51	3,24	17,15	3,47	1,62	0,65

Ve frakci FFA převládaly z nasycených mastných kyselin – kyselina palmitová (0 – 30 let: c = 381,09 ± 356,05 μmol/l, 31 – 60 let: c = 213,35 ± 44,22 μmol/l, 61 – 70 let: c = 666,08 ± 88,67 μmol/l, 71 +: c = 114,52 ± 48,87 μmol/l) a kyselina stearová (0 – 30 let: c = 87,54 ± 62,12 μmol/l, 31 – 60 let: c = 62,84 ± 10,80 μmol/l, 61 – 70 let: c = 121,46 ± 21,18 μmol/l, 71 +: c = 45,25 ± 18,50 μmol/l).

Z lichých mastných kyselin převládaly – kyselina pentadekanová (0 – 30 let: c = 30,75 ± 31,03 μmol/l, 31 – 60 let: c = 5,28 ± 1,40 μmol/l, 61 – 70 let: c = 126,60 ± 33,15 μmol/l, 71 +: c = 11,97 ± 7,67 μmol/l) a kyselina nonadekanová (0 – 30 let: c = 6,24 ± 4,42 μmol/l, 31 – 60 let: c = 5,01 ± 1,23 μmol/l, 61 – 70 let: c = 5,04 ± 1,48 μmol/l, 71 +: c = 4,89 ± 2,38 μmol/l).

Ve věkové skupině 61 – 70 let nabyla kyselina olejová c = 124,47 ± 19,10 μmol/l a kyselina 13-methylmyristová c = 19,10 ± 4,69 μmol/l.

Tabulka 13 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce FFA.

	9-desaturáza				9-desaturáza x 100				elongáza x 100			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 14 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce FFA – pokračování.

	5-desaturáza				6-desaturáza x 100				*de novo* lipogeneze			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 15 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu pro určité věkové skupiny ve frakci TAG.

frakce TAG								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71+**	
kyselina	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**
12-methyltridekanová	4,46	4,25	3,26	0,85	4,81	0,81	6,88	1,62
myristová	8,90	4,44	7,42	1,66	13,23	3,39	5,63	1,63
13-methylmyristová	1,48	1,14	1,21	0,27	1,49	0,37	1,05	0,42
12-methyltetradekanová	12,94	13,00	19,98	6,19	19,06	2,70	11,95	2,63
pentadekanová	2,74	0,61	6,03	1,86	4,71	0,78	1,74	0,74
palmitová	100,71	43,46	222,07	40,19	134,51	32,02	75,58	28,13
*trans*palmitoolejová	0,98	0,52	1,10	0,31	1,09	0,20	1,05	0,43
sapienová	27,33	20,98	9,12	1,45	11,70	1,65	6,74	2,20
cis palmitoolejová	1,98	1,24	2,73	1,34	4,69	0,72	13,59	5,72
14-methylhexadekanová	1,20	0,48	1,23	0,27	1,33	0,35	0,69	0,26
heptadekanová	1,00	0,48	0,60	0,18	0,70	0,22	1,04	0,37
16-methylheptadekanová	1,00	0,62	1,95	0,57	1,37	0,31	1,19	0,25
stearová	40,75	13,48	46,97	9,81	41,48	9,67	3,72	1,10
trans vacenová	6,02	5,77	3,87	1,10	3,66	0,86	2,51	1,53
olejová	75,62	74,59	17,04	3,37	12,65	1,81	21,52	15,52
vacenová	41,66	27,32	29,53	5,41	30,12	6,18	4,15	1,95
nonadekanová	2,90	1,84	2,66	0,96	3,15	0,79	3,36	1,61
linolová	19,72	13,09	13,11	3,25	8,55	1,93	11,96	3,57
gama-linolenová	2,66	2,51	2,54	0,69	1,83	0,40	2,44	0,70
arachidová	4,15	2,70	24,90	12,97	4,58	0,99	2,61	0,84
alpha-linolenová	1,39	1,17	1,21	0,38	1,40	0,40	1,40	0,49
oktadekadienová	15,35	3,99	18,45	4,90	33,63	45,57	12,57	5,19
oktadekadienová	13,43	8,70	21,95	5,36	21,57	6,34	88,01	96,20
stearidová	3,32	2,24	6,11	1,56	2,43	0,58	3,95	3,03
cis 8,11,14-eikosatrienová	0,90	0,59	0,79	0,29	1,36	0,16	1,11	0,36
behenová	2,27	1,84	1,67	0,38	2,28	0,58	2,38	0,68
arachidonová	3,93	3,96	4,12	1,29	4,45	1,03	5,74	1,91
eikosatetraenová	2,21	1,70	1,60	0,42	1,25	0,31	1,61	0,41
eikosapentaenová	64,61	63,56	114,58	15,80	142,60	25,52	25,66	10,43
lignocerová	14,76	11,83	33,56	9,71	28,27	5,93	4,83	3,99
dokosatetraenová	1,82	1,43	1,78	0,86	1,56	0,44	1,26	0,70
nervová	6,08	1,19	2,72	0,53	11,29	8,79	2,71	1,06
dokosapentaenová	11,02	2,04	12,35	5,08	5,50	3,02	3,30	0,89
dokosapentaenová	0,88	0,58	0,91	0,20	1,31	0,34	1,21	0,28
dokosahexaenová	6,04	6,39	8,80	2,65	1,30	0,29	5,60	2,31
cerotová	1,36	0,33	1,69	0,54	1,52	0,24	1,21	0,32
tetrakosatetraenová	2,25	1,26	2,09	0,53	3,10	0,67	1,92	0,78
tetrakosapentaenová	2,62	2,32	4,12	0,74	6,31	1,19	5,00	0,88
tetrakosapentaenová	1,70	0,36	1,72	2,11	1,44	0,30	1,40	0,42
tetrakosahexaenová	6,15	4,59	16,79	2,24	22,62	3,30	4,78	2,29
9-desaturáza	1,47	1,34	0,39	0,13	0,32	0,09	6,37	4,86
9-desaturáza x 100	1,79	0,51	1,25	0,60	3,68	0,98	23,11	17,05
elongáza x 100	42,54	7,37	21,79	5,89	32,56	10,85	5,57	2,48
5-desaturáza	3,17	2,65	5,85	2,72	3,32	0,85	5,58	2,54
6-desaturáza x 100	5,15	3,88	6,39	2,73	16,73	4,52	29,81	100,63
de novo lipogeneze	6,48	3,12	17,60	4,34	16,50	5,81	23,40	85,08

Ve frakci TAG převládaly z nasycených mastných kyselin – kyselina palmitová (0 – 30 let: c = 100,71 ± 43,46 μmol/l, 31 – 60 let: c = 222,07 ± 40,19 μmol/l, 61 – 70 let: c = 134,51 ± 32,02 μmol/l, 71 +: c = 75,58 ± 28,13 μmol/l), kyselina eikosapentaenová (0 – 30 let: c = 64,61 ± 63,56 μmol/l, 31 – 60 let: c = 114,58 ± 15,80 μmol/l, 61 – 70 let: c = 142,60 ± 25,52 μmol/l, 71 +: c = 25,66 ± 10,43 μmol/l) a kyselina stearová (0 – 30 let: c = 40,75 ± 13,48 μmol/l, 31 – 60 let: c = 46,97 ± 9,81 μmol/l, 61 – 70 let: c = 41,48 ± 9,67 μmol/l, 71 +: c = 3,72 ± 1,10 μmol/l).

Z lichých mastných kyselin převládaly – kyselina pentadekanová (0 – 30 let: c = 2,74 ± 0,61 μmol/l, 31 – 60 let: c = 6,03 ± 1,86 μmol/l, 61 – 70 let: c = 4,71 ± 0,78 μmol/l, 71 +: c = 1,74 ± 0,74 μmol/l) a kyselina nonadekanová (0 – 30 let: c = 2,90 ± 1,84 μmol/l, 31 – 60 let: c = 2,66 ± 0,96 μmol/l, 61 – 70 let: c = 3,15 ± 0,79 μmol/l, 71 +: c = 3,36 ± 1,61 μmol/l).

V této frakci nabývala kyselina *cis* palmitoolejová nejvyšších hodnot, a to převážně ve věkové skupině 71 + c = 13,59 ± 5,72 μmol/l. Liché mastné kyseliny byly zkoumány u *diabetes mellitus* II. typu, kdy v návaznosti na skupinu okolo pana Janečka byl prokázán pokles koncentrace kyseliny *cis* palmitoolejové u nemocných lidí na rozdíl od zdravé populace (Janeček, 2018).

Tabulka 16 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce TAG.

	9-desaturáza				9-desaturáza x 100				elongáza x 100			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 17 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce TAG – pokračování.

	5-desaturáza				6-desaturáza x 100				*de novo* lipogeneze			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 18 – Koncentrace mastných kyselin v ušním mazu pro určité věkové skupiny ve frakci EC.

frakce EC								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71+**	
kyselina	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	**STD [µmol/l]**
12-methyltridekanová	1,04	0,33	1,50	0,38	1,34	0,29	1,05	0,43
myristová	2,52	0,21	4,55	0,88	21,61	8,84	5,23	2,00
13-methylmyristová	23,97	6,19	20,47	3,11	33,97	10,55	19,87	2,62
12-methyltetradekanová	1,06	0,43	0,54	0,19	1,07	0,53	0,54	0,18
pentadekanová	1,65	1,00	0,94	0,39	1,09	0,32	0,75	0,32
palmitová	70,33	6,66	49,98	7,03	103,64	42,95	48,38	18,50
*trans*palmitoolejová	6,10	3,17	28,18	6,60	43,65	24,45	21,76	15,68
sapienová	6,40	0,97	12,14	2,94	10,64	2,43	8,19	1,20
cis palmitoolejová	0,52	0,07	0,93	0,23	3,28	2,00	0,47	0,18
14-methylhexadekanová	0,38	0,08	0,57	0,33	0,86	0,37	0,80	0,46
heptadekanová	2,11	0,77	1,63	0,49	3,68	1,81	2,32	1,45
16-methylheptadekanová	0,87	0,13	0,87	0,26	1,03	0,43	0,71	0,17
stearová	0,94	0,23	1,44	0,30	1,58	0,58	1,32	0,20
trans vacenová	88,50	58,32	49,02	5,66	69,06	19,00	93,12	18,79
olejová	3,29	2,22	5,77	1,25	4,07	2,03	4,08	2,27
vacenová	3,12	0,51	3,55	0,72	7,71	4,20	3,54	0,63
nonadekanová	30,63	8,40	24,06	3,19	28,65	21,67	56,37	17,61
linolová	0,69	0,36	0,95	0,28	0,79	0,35	0,77	0,26
gama-linolenová	0,69	0,14	1,10	0,37	2,85	1,39	0,80	0,23
arachidová	0,85	0,18	4,94	1,04	1,47	0,79	1,34	0,73
alpha-linolenová	1,63	0,38	1,96	0,66	2,27	1,69	2,34	1,36
oktadekadienová	3,63	1,67	18,87	3,17	3,75	1,48	1,73	1,27
oktadekadienová	60,14	17,02	28,68	3,63	53,62	16,10	17,21	15,13
stearidová	9,45	7,02	1,56	0,33	4,04	2,88	2,64	1,57
cis 8,11,14-eikosatrienová	1,44	0,36	5,95	1,58	0,72	0,44	0,23	0,16
behenová	2,81	0,89	3,92	0,87	14,23	7,27	3,54	1,83
arachidonová	1,69	0,96	2,22	0,57	9,86	8,15	2,19	1,50
eikosatetraenová	12,23	11,50	3,49	0,83	2,60	1,83	1,61	0,90
eikosapentaenová	9,56	3,54	24,25	1,91	31,82	25,47	8,38	3,97
lignocerová	2,34	1,73	6,15	1,15	4,87	2,86	3,33	1,57
dokosatetraenová	1,24	0,36	1,09	0,25	2,02	1,03	0,89	0,28
nervová	10,88	5,99	26,18	3,39	32,17	15,37	29,72	6,46
dokosapentaenová	5,40	1,20	4,89	1,05	5,27	1,27	4,18	0,98
dokosapentaenová	0,30	0,16	0,31	0,15	0,49	0,22	0,33	0,19
dokosahexaenová	1,27	0,78	0,81	0,22	3,08	1,87	0,64	0,42
cerotová	2,07	1,69	3,38	0,58	1,62	0,84	0,96	0,54
tetrakosatetraenová	11,76	7,62	14,08	1,74	4,71	2,07	10,29	3,96
tetrakosapentaenová	1,72	0,54	1,26	0,27	1,52	0,79	1,08	0,29
tetrakosapentaenová	0,53	0,19	0,37	0,13	0,42	0,21	0,34	0,14
tetrakosahexaenová	1,27	0,26	1,35	0,32	1,34	0,48	1,16	0,42
9-desaturáza	3,28	1,76	4,24	1,37	3,01	1,94	3,06	1,62
9-desaturáza x 100	0,73	0,10	1,88	0,53	2,91	1,25	1,10	0,51
elongáza x 100	1,33	0,25	2,90	0,57	1,98	1,48	3,04	1,00
5-desaturáza	1,11	0,44	0,39	0,14	15,01	14,84	12,08	9,39
6-desaturáza x 100	243,41	98,08	651,15	167,80	96,47	57,20	33,57	25,27
de novo lipogeneze	126,29	56,52	55,43	13,04	145,73	80,07	70,94	37,77

Ve frakci EC převládala z nasycených mastných kyselin – kyselina palmitová (0 – 30 let: c = 70,33 ± 6,66 μmol/l, 31 – 60 let: c = 49,98 ± 7,03 μmol/l, 61 – 70 let: c = 103,64 ± 42,95 μmol/l, 71 +: c = 48,38 ± 18,50 μmol/l).

Z lichých mastných kyselin převládaly – kyselina 13-methylmyristová (0 – 30 let: c = 23,97 ± 6,19 μmol/l, 31 – 60 let: c = 20,47 ± 3,11 μmol/l, 61 – 70 let: c = 33,97 ± 10,55 μmol/l, 71 +: c = 19,87 ± 2,62 μmol/l) a kyselina nonadekanová (0 – 30 let: c = 30,63 ± 8,40 μmol/l, 31 – 60 let: c = 24,06 ± 3,19 μmol/l, 61 – 70 let: c = 28,65 ± 21,67 μmol/l, 71 +: c = 56,37 ± 17,61 μmol/l).

Tabulka 19 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce EC.

	9-desaturáza				9-desaturáza x 100				elongáza x 100			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Tabulka 20 – Významnost mastných kyselin v závislostech na enzymech u věkových skupin u frakce EC – pokračování.

	5-desaturáza				6-desaturáza x 100				*de novo* lipogeneze			
kyselina	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
12-methyltridekanová												
myristová												
13-methylmyristová												
12-methyltetradekanová												
pentadekanová												
palmitová												
*trans*palmitoolejová												
sapienová												
cis palmitoolejová												
14-methylhexadekanová												
heptadekanová												
16-methylheptadekanová												
stearová												
trans vacenová												
olejová												
vacenová												
nonadekanová												
linolová												
gama-linolenová												
arachidová												
alpha-linolenová												
oktadekadienová												
oktadekadienová												
stearidová												
cis 8,11,14-eikosatrienová												
behenová												
arachidonová												
eikosatetraenová												
eikosapentaenová												
lignocerová												
dokosatetraenová												
nervová												
dokosapentaenová												
dokosapentaenová												
dokosahexaenová												
cerotová												
tetrakosatetraenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosapentaenová												
tetrakosahexaenová												

Vzorky ušního mazu (viz Příloha A) byly rozděleny do 4 skupin dle věku (viz Tabulka 3). Skupiny byly určeny tak, aby bylo pokryto široké rozmezí a zároveň, aby byly v každé skupině minimálně 3 vzorky od každého pohlaví. Celkový počet 71 vzorků zahrnoval 35 vzorků žen a 36 vzorků mužů. Vzorky ušních špuntů jsem dostala od lékařů z Pardubického a Královehradeckého kraje. Špunty byly vytahovány háčkem. Nejmladším jedincům bylo 5 let, nejstarším okolo 90 let. Ve skupině vzorků převládaly vzorky pro skupiny 3 a 4, tedy pro osoby starší 61 let. Podle vzhledu převažoval mokrý typ (63,38 %) ušního mazu nad suchým (36,62 %).

Vzorky byly navažovány na analytických vahách do 3 eppendorfek – 2,5 mg, 5 mg a 10 mg. U prvních vzorků byly změřeny všechny 3 navážky, avšak chromatografický záznam pro nejnižší navážku se kvůli různorodosti píků oproti dalším navážkám nepoužíval. U dalších vzorků byla analyzována pouze navážka 10 mg, stejně jako u analýz prováděných okolo pana doktora Pokorného. Výsledné koncentrace byly přepočítány na hmotnost 10 mg z původní navážky.

Veškeré výsledky jsou shrnuty v Tabulce 6 – 20, výsledky pro obě pohlaví jsou v Příloze B – F. Klinicky významné mastné kyseliny se liší podle věku. Nejvíce klinicky významných mastných kyselin můžeme pro jednotlivé frakce nalézt u skupin (0 – 30 let a 31 – 60 let), avšak u frakce EC je počet klinicky významných kyselin vyšší u starší populace (60 +).

Skupina okolo pana Pokorného vážila odpařený vzorek ušního mazu a výsledky porovnávala s krevním sérem pacientů. Výsledky tohoto výzkumu byly různé oproti krevnímu séru. V některých fracích byly hodnoty v ušním mazu vyšší než v krevním séru, v jiných naopak. Předpokládalo se, že by měly být hodnoty lipidových frakcí v ušním mazu a séru podobné, jelikož látky do ušního mazu vstupují právě z krevního řečiště. Protože jsem neměla k dispozici séra pacientů, kterým byl odebrán ušní maz nemohla jsem poměr porovnat.

Tabulka 21 – Průměrná koncentrace 40-ti mastných kyselin pro jednotlivé frakce a věkové skupiny.

	PL	**DG**	**FFA**	**TAG**	**EC**
věkové skupiny	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**
0 – 30	576,15 ± 161,12	365,46 ± 58,81	956,16 ± 725,59	520,28 ± 352,58	386,99 ± 154,24
31 – 60	621,06 ± 120,66	297,64 ± 61,04	618,96 ± 165,52	674,32 ± 148,27	363,90 ± 58,44
61 – 70	594,35 ± 103,80	307,72 ± 48,62	1532,71 ± 262,49	599,90 ± 171,15	522,47 ± 237,29
71 +	422,23 ± 157,00	242,57 ± 105,93	483,71 ± 261,57	355,05 ± 203,84	364,21 ± 126,83

Tabulka 22 – Průměrná koncentrace 40-ti mastných kyselin pro jednotlivé frakce, věkové skupiny a pohlaví.

		PL	DG	FFA	TAG	EC
věkové skupiny a pohlaví		$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**	$\bar{c}$ **[µmol/l]**
0 – 30	**M**	649,71 ± 71,13	371,79 ± 30,67	1611,33 ± 156,57	839,25 ± 102,91	485,72 ± 61,19
	Ž	502,59 ± 49,32	359,12 ± 33,46	301,00 ± 36,62	201,31 ± 34,84	288,27 ± 22,95
31 – 60	**M**	668,71 ± 89,33	307,64 ± 44,54	626,81 ± 118,95	662,62 ± 111,96	373,22 ± 46,95
	Ž	580,74 ± 97,56	289,19 ± 61,96	612,32 ± 144,75	684,22 ± 131,59	356,01 ± 55,52
61 – 70	**M**	583,60 ± 83,15	309,64 ± 41,71	1514,02 ± 200,50	589,52 ± 121,18	632,94 ± 173,55
	Ž	612,78 ± 109,22	304,41 ± 50,21	1564,76 ± 281,96	617,68 ± 167,66	333,08 ± 125,00
71 +	**M**	457,75 ± 144,58	193,89 ± 64,00	538,73 ± 263,71	375,90 ± 163,17	434,45 ± 121,86
	Ž	394,32 ± 142,70	280,81 ± 103,83	440,48 ± 178,41	338,66 ± 203,28	309,01 ± 65,39

Chtěla bych se přiklonit k výzkumu pana Koçera z roku 2008, který určoval lipidovou složku ušního mazu v závislosti na pohlaví, věku a stádiu menstruačního cyklu. K analýze využil také tenkovrstvou chromatografii a vzorky měl rozdělené dle věku (1 – 10 let, 11 – 18 let, 19 – 40 let a více jak 40 let). (Koçer, 2008)

Průměrné koncentrace mastných kyselin pro určité frakce jsou uvedeny v Tabulce 21, 22. Stejně jako pan Koçer jsem prokázala rozdílné hodnoty lipidových složek v *cerumenu* v závislosti na věku a pohlaví. Ve věkové skupině 0 – 30 let je rozdíl mezi pohlavími patrný hlavně u frakce PL, FFA, TAG a EC. U skupiny 31 – 60 let je nejvyšší rozdíl mezi pohlavími u frakce PL, ve skupině 61 – 70 let u frakce EC a u lidí starších 71 let jsou rozdíly v DG frakci.

Kvůli zajištění dostatečného množství vzorků ve skupinách jsem však vzorky dle pohlaví neodlišovala. Věková skupina nad 71 let (bez rozdílu pohlaví) obsahovala nejnižší hodnoty koncentrací mastných kyselin pro jednotlivé frakce. V závěrečných analýzách jsem se vzorky pracovala dohromady, protože u první skupiny (0 – 30 let) jsem měla k dispozici pouze 8 vzorků (4 muži a 4 ženy).

Nejvíce koncentrované liché mastné kyseliny byly kyseliny nonadekanová a pentadekanová. Právě vyšší koncentrace kyseliny pentadekanové byly prokázány i ve výzkumu pana Janečka, který také prokázal rozdílné koncentrace lichých mastných kyselin v různých frakcích u *diabetes mellitus* II. typu. U frakce EC byla místo kyseliny pentadekanové zastoupena kyselina 13-methylmyristová, což je izoforma C15:0. Proto lze říci, že nejvyšší hodnoty koncentrací z lichých mastných kyselin zaujímaly C15:0 a C19:0. (Janeček, 2018)

V roce 2019 provedl pan Barbosa a jeho tým výzkum mastných kyselin v ušním mazu zaměřený na souvislost s rakovinou. Rakovinové biomarkery se nacházely ve vyšších koncentracích nejen v ušním mazu, ale dále např. ve slinách, stolici, moči a krvi. Kyselina

stearová byla spojena s rakovinou prsu (krev) a rakovinou tlustého střeva a konečníku (stolice). Kyselina nonadekanová byla také spojena s kolorektálním karcinomem (stolice) a kyselina myristová s rakovinou jícnu (moč, krev). Skupina určila navíc ještě kyselinu dodekanovou jako biomarker leukemie. (Barbosa, 2019)

V každém výzkumu jsou věkové hranice mírně posunuté. Jelikož jsem měla nejvíce zastoupenou populaci lidí, kteří již jsou v důchodovém věku musela jsem i tuto skupinu rozdělit na dvě (61 – 70 let a 71 +), abych měla rovnoměrné zastoupení ve skupinách. Vyšší počet vzorků ve skupinách 3 a 4 svědčí o častých problémech se sluchem kvůli nahromadění ušního mazu. Díky lékařům, kteří špunt odstraní dojde k uvolnění zvukovodu a ke zlepšení funkce jednoho z pěti smyslů.

4 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá chromatografickou analýzou ušního mazu. Ušním maz je přirozeně tvořen v uchu. Ucho patří mezi jeden z pěti lidských smyslů. I když řadíme sluch mezi nejcitlivější smysly, je výrazně horší než u zvířat a výrazně se zhoršuje spolu s rostoucím věkem.

Ušní maz lze analyzovat různými metodami chromatografie. Za objevitele chromatografie je považovaný ruský botanik Tsvet, který v roce 1901 odhalil fyzikálně-chemický základ separace. K analýze lze využít i tenkovrstvou chromatografii, kdy dochází k vyvíjení na tenké vrstvě desky. Mezi přesnější metody měření lze zařadit plynovou chromatografii, kterou provedl Erik Cremer v roce 1944.

Ze vzorků ušních špuntů, které byly získány z Pardubického a Královehradeckého kraje byla určena průměrná koncentrace 40 mastných kyselin a následně byla v závislosti na enzymech stanovena jejich klinická významnost. Počty klinicky významných mastných kyselin i jejich koncentrace se lišily dle věku osob. Lze zaznamenat i rozdíly mezi pohlavím.

Nejvyšší koncentrace mastných kyselin v jednotlivých frakcích zaujímaly dle očekávání kyseliny palmitová a stearová. Z lichých mastných kyselin byly nejčastější kyseliny pentadekanová a nonadekanová. Obě mastné kyseliny se liší o jeden uhlík od nejčastěji zastoupených nasycených mastných kyselin, což může být i jeden z důvodů vyšší koncentrace. Kyselina nonadekanová byla určena jako biomarker, což může být také důvod zvýšených hodnot. Tuto možnost, však nelze potvrdit, jelikož ke konečné diagnóze je zapotřebí větší množství laboratorních testů.

Myslím si, že případné další výzkumy spojené s analýzou ušního mazu by měly brát v potaz nejen věkové rozmezí, ale i pohlaví a případně i typ ušního mazu. Jedná se o materiál, který nevyžaduje invazivní odběr, avšak práce s ním, není tak jednoduchá jako v současné době např. s krví. Nemyslím si, že by byla analýza ušního mazu zbytečná. Již dříve se podařilo pomocí jeho analýzy určit *diabetes mellitus* a dnes se vyvíjí metoda pro určení rakoviny. Výzkumy ušního mazu a rakoviny jsou v počátcích, doufejme, že analýzy proběhnou podle plánu a spolu i s dalšími výzkumy z jiných odvětví se podaří rakovinu dříve odhalit.

5 POUŽITÁ LITERATURA

BARBOSA João Marcos Gonçalves, Naiara Zedes PEREIRA, Lurian Caetano DAVID a kol. Cerumenogram: a new frontier in cancer diagnosis in humans. *Scientific Reports*. 2019, **9**(11722): 1-9.

BAILEY Regina. Fats, Steroids, and Other Examples of Lipids. In: *ThoughtCo.* [online]. New York: Molly Fergus, 2020, [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: https://www.thoughtco.com/lipids-373560.

BŘÍŽĎALA Jan. Lipidy. In: *E-chembook* [online]. Třebíč: Břižďala, 2020, [cit. 2021-7-8]. Dostupné z: http://e-chembook.eu/cz/biochemie/Lipidy.pdf.

CAILLON Lucie, Vincent NIETO, Pauline GEHAN, Mohyeddine OMRANE, Nicolas RODRIGUEZ, Luca MONTICELLI a Abdou Rachid THIAM. Triacylglycerols sequester monotopic membrane proteins to lipid droplets. *Nature Communications*. 2020, **11**(3944): 1-12.

DYLEVSKÝ Ivan, 2009. *Funkční anatomie.* 1. vyd., Praha: Grada, 2009, ISBN 978-80-247-3240-4.

DYLEVSKÝ Ivan. *Somatologie: pro předmět Základy anatomie a fyziologie člověka*. 3. vyd., Praha: Grada, 2019, ISBN 978-80-271-2111-3.

FILLMORE Natasha, Osama Abo ALROB a Gary D. LOPASCHUK. Fatty Acid beta-Oxidation. In: *AOCS Lipid Library* [online]. USA: The American Oil Chemists' Society, 2021, [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: https://lipidlibrary.aocs.org/chemistry/physics/animal-lipids/fatty-acid-beta-oxidation.

HANSEN Grace. *Earwax*. 1. vyd., Minnesotta: Abdo Kids, 2020, ISBN 9781644943847.

HIRT Miroslav a František VOREL. *Soudní lékařství II. díl*. 1. vyd., Praha: Grada, 2016, ISBN 978-80-271-0268-6.

CHERIYEDATH Susha. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Applications. In: *News Medical: life sciences* [online]. Manchester: Cheriyedath, 2019, [cit. 2021-9-23]. Dostupné z: https://www.news-medical.net/life-sciences/Gas-Chromatography-Mass-Spectrometry-(GC-MS)-Applications.aspx.

JANEČEK Radim, Martina ŠPRYNCOVÁ a Alexander ČEGAN. Odd-numbered fatty acids in type 2 diabetes mellitus. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A; Faculty of Chemical Technology*. 2018, **24**: 101-107.

KELLER Roy A. a Calvin J. GIDDINGS. Chromatography: chemistry. *Encyclopædia Britannica* [online]. Chicago: J.E. Luebering, 2021, [cit. 2021-9-8]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/chromatography.

KIM Se-Kwon a Fatih KARADENIZ. Biological importance and applications of squalene and squalane. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2012, **1**(65): 223-233.

KIMURA Ikuo, Atsuhiko ICHIMURA, Ryuji OHUE-KITANO a Miki IGARASHI. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2019, **100**(1): 171-210.

KOÇER Mustafa, Tayfun GÜLDÜR, Mustafa AKARÇAY, Murat Cem MIMAN a Gülçin BEKER. Investigation of age, sex and menstrual stage variation in human cerumen lipid composition by high performance thin layer chromatography. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2008, **122**(9): 881-886.

KONŠTACKÝ Stanislav. Otoskopie v rukou praktického lékaře. *Practicus: pro praktické lékaře zdarma*. 2020, **19**(5): 3-21.

КОЛЬМАН Ян. а Клаус-Генрих РЁМ. *Наглядная биохимия*. 6. vyd., Москва: Лаборатория знаний, 2019, ISBN 978-5-00101-645-8.

KOPECKÁ Ivana a Eva SVOBODOVÁ. *Metody průzkumu historických materiálů*. 1. vyd., Praha: Grada, 2019, ISBN 978-80-271-2240-0.

KOPLÍK Richard. Separační metody. *VŠCHT – Prof. Dr. Ing. Richard Koplík: Ústav analýzy potravin a výživy* [online]. Praha: Koplík, 2007, [cit. 2021-9-1]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6_1.pdf.

LECLAIR Renee J. 6.1: Cholesterol synthesis. In: *Medicine: LibreTexts* [online]. California: Virginia Tech Libraries' Open Education Initiative, 2021, [cit. 2022-02-07]. Dostupné z: https://med.libretexts.org/Bookshelves/Basic_Science/Cell_Biology%2C_Genetics%2C_and_Biochemistry_for_Pre-Clinical_Students/06%3A_Lipoprotein_Metabolism_and_Cholesterol_Synthesis/6.01%3A_Cholesterol_Synthesis.

LUDVÍK Miloslav. *Český lékopis*. 1. vyd., Praha: Grada, 2017, ISBN 978-80-271-0500-7.

MCNAIR Harold. Introduction to GC. In: *Chromedia: Analytical sciences* [online]. USA: Virginia Tech, 2021, [cit. 2021-12-10]. Dostupné z: https://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHiemBpdmBlIEcCtB&subNav=tlpbfDsHiemBpdmBlIEcCtBmB.

MOUREK Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vyd., Praha: Grada, 2012, ISBN 978-80-247-3918-2.

MUKNŠNÁBLOVÁ Martina. *Péče o dítě s postižením sluchu*. 1. vyd., Praha: Grada, 2014, ISBN 978-80-247-5034-7.

MUSIEK Frank E. a Jane A. BARAN. *The auditory system: anatomy, physiology, and clinical correlate*. 2.vyd., San Diego: CA Plural Publishing, 2020, ISBN 9781944883003.

NIKOLOVA Irina. Chromatografické metody. In: *Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem: Přírodovědecká fakulta* [online]. Ústí nad Labem: UJEP, 2014, [cit. 2021-9-3]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf.

OREL Miroslav. *Anatomie a fyziologie lidského těla: pro humanitní obory*. 1. vyd., Praha: Grada, 2019, ISBN 978-80-271-0531-1.

OVERFIELD Theresa. *Biological Variation in Health and Illness: Race, Age, and Sex Differences*. 2. vyd., USA: CRC Press, Taylor & Francis, 2017, ISBN 978-1-138-10484-6.

PALMER Michael. *Human Metabolism Lecture Notes*.1. vyd., Canada: Department of Chemistry University of Waterloo, 2014. ISBN 978-0-9937882-0-8.

POKORNÝ Karel, Alexandr ČEGAN, Jiří SKALICKÝ a Milan MELOUN. Lipidová složka ušního mazu: Metodika kvalitativní a kvantitativní analýzy. *Otorynolaryngol. chir. hlavy krku*. 2007, **1**(1): 37-42.

POKORNÝ Karel a Milan MELOUN. Závislost množství ušního mazu na anatomických poměrech ve zvukovodu. *Otorinolaryngologie a foniatrie*. 2009, **58**(1): 19-28.

PROKOP-PRIGGE Katharine A., Corrine J. MANSFIELD, Rockwell M. PARKER, Erica THALER, Elizabeth A. GRICE, Charles J. WYSOCKI a George PRETI, 2015. Ethnic/Racial and Genetic Influences on Cerumen Odor Profiles. *Journal of Chemical Ecology*. 2015, **41**(1): 67-74.

ROGERS Jennifer. Thin Layer Chromatography. *Chemistry: LibreTexts* [online]. Kalifornie: The LibreTexts, 2019, [cit. 2021-9-1]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography.

SHARMA Sangita. *Klinická výživa a dietologie: v kostce*. 1. vyd., Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-271-0228-0.

SHOKRY Engy a Nelson Roberto Antoniosi FILHO. Insights into cerumen and application in diagnostics: past, present and future prospective. *Biochemia Medica*. 2017, **27**(3): 1-15.

SPILKOVÁ Jiřina. *Farmakognozie*. 1. vyd., Praha: Karolinum, 2016, ISBN 978-80-246-3264-3.

SOULT Allison. Phospholipids in Cell Membranes. In: *Chemistry: LibreTexts* [online]. Kalifornie: The LibreTexts, 2020, [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_Kentucky/UK%3A_CHE_103_-_Chemistry_for_Allied_Health_(Soult)/Chapters/Chapter_14%3A_Biological_Molecules/14.3%3A_Phospholipids_in_Cell_Membranes.

TÁBORSKÁ Eva. Syntéza a odbourání mastných kyselin, ketogeneze. In: *Masarykova univerzita* [online]. Praha: MUNI, 2016, [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLKBC0211p/um/Synteza_a_odbourani_mastnych_kyselin2016.pdf.

TALLEY Jacob T. a Shamim S. MOHIUDDIN. Biochemistry, Fatty Acid Oxidation. In: *National Center for Biotechnology Information Search database Search term* [online]. USA: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021, [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556002/.

VÁVROVÁ Jaroslava. Chromatografické metody – úvod, přehled. *Datový standard MZ ČR DS* [online]. Praha: Straka, 2004, [cit. 2021-9-8]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.stapro.cz/hypertext/200640/hypertext/AJAOF.htm.

VENTON B. Jill. Gas Chromatography (GC) with Flame-Ionization Detection. In: *JoVE* [online]. Virginia: MyJoVE Corporation, 2021, [cit. 2021-10-5]. Dostupné z: https://www.jove.com/v/10187/gas-chromatography-gc-with-flame-ionization-detection.

VOTAVA Leo. Teorie a výzkum: Lidské ucho, jeho anatomie a funkce. In: *TOMATIS Praha* [online]. Praha: Meditor, 2015, [cit. 2021-7-8]. Dostupné z: http://www.tomatis-praha.cz/index.php?id=o-metode-tomatis-hlavni-body&idp=teorie-a-vyzkum.

WEBSTER Grant. What is Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)? In: *AZO: life sciences* [online]. Manchester: Webster, 2021, [cit. 2021-9-23]. Dostupné z: https://www.azolifesciences.com/article/What-is-Gas-Chromatography-Mass-Spectrometry-(GC-MS).aspx.

ZACHAŘ Pavel a David SÝKORA. Plynová chromatografie. In: *Ústav analytické chemie VŠCHT Praha* [online]. Praha: VSCHT, 2019, [cit. 2021-10-5]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf.

ZEMAN Miroslav, Jaroslav MACÁŠEK, Marek VECKA, Barbora STAŇKOVÁ a Aleš ŽÁK. Elongázy mastných kyselin a jejich účast v patogeneze chorobných stavů. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2019, **27**(48): 66–71.

ŽÁKOVÁ Pavla. Lipidy: rozdělení a funkce. In: *Univerzita Pardubice: Dokumenty*. Pardubice: UPCE, 2019.

6 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A – *Analyzované vzorky ušního mazu* 79
Příloha B – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce PL – věkové skupiny, pohlaví*.....80
Příloha C – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce DG – věkové skupiny, pohlaví*.....81
Příloha D – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce FFA – věkové skupiny, pohlaví*...82
Příloha E – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce TAG– věkové skupiny, pohlaví*....83
Příloha F – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce EC – věkové skupiny, pohlaví*.....84

Příloha A – *Analyzované vzorky ušního mazu*

číslo vzorku	***pohlaví***	***věk***	***typ, pozn.***
1	M	65	S, 2x
2	Ž	57	S, 2x
3	Ž	88	S, 2x
4	M	33	M, 2x
5	Ž	68	M, 2x
6	M	87	M
7	M	74	M
8	M	61	M
9	Ž	73	S
10	M	61	M
11	Ž	66	S
12	Ž	64	M
13	Ž	42	M
14	Ž	24	S
15	Ž	63	M
16	M	57	M
17	M	45	S
18	M	69	M
19	M	26	S
20	M	68	S
21	Ž	5	M
22	M	60	M
23	Ž	63	M
24	M	84	M
25	M	66	M

číslo vzorku	***pohlaví***	***věk***	***typ***
26	M	91	S
27	Ž	77	S
28	M	71	M
29	Ž	90	S
30	M	5	S
31	M	69	M
32	M	42	M
33	M	63	M
34	Ž	73	M
35	M	67	M
36	Ž	65	M
37	M	80	M
38	Ž	76	M
39	M	61	S
40	Ž	55	S
41	Ž	33	M
42	M	48	S
43	Ž	78	S
44	M	66	S
45	Ž	31	M
46	Ž	88	S
47	Ž	50	M
48	M	73	S
49	Ž	86	S
50	Ž	10	M

číslo vzorku	***pohlaví***	***věk***	***typ***
51	M	28	M
52	M	77	S
53	Ž	33	S
54	Ž	82	M
55	Ž	54	M
56	Ž	75	S
57	M	84	S
58	M	33	M
59	Ž	47	M
60	M	52	M
61	M	59	M
62	M	85	M
63	Ž	39	M
64	Ž	73	S
65	M	33	M
66	Ž	87	M
67	Ž	38	M
68	Ž	35	S
69	Ž	30	M
70	M	11	M
71	M	86	M

Příloha B – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce PL – věkové skupiny, pohlaví*

frakce PL								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71 +**	
kyselina, enzymy	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**
12-methyltridekanová	2,15	0,54	2,77	1,50	1,21	1,24	1,43	1,27
myristová	8,39	8,58	8,19	11,01	16,26	19,85	9,51	11,93
13-methylmyristová	1,24	1,21	1,27	1,80	1,12	1,16	1,23	1,48
12-methyltetradekanová	1,57	0,94	1,88	2,00	4,69	5,21	1,68	1,50
pentadekanová	3,80	2,36	3,65	3,85	8,03	9,22	3,71	4,16
palmitová	167,39	138,47	244,02	205,78	161,41	157,39	122,13	85,91
*trans*palmitoolejová	0,41	0,26	0,52	0,53	0,92	0,95	0,78	0,45
sapienová	7,08	5,19	7,59	9,09	6,83	4,70	4,66	4,88
cis palmitoolejová	1,45	1,20	1,75	2,08	2,64	3,05	1,53	1,28
14-methylhexadekanová	1,70	1,56	1,37	2,12	2,57	2,85	1,99	1,39
heptadekanová	0,60	0,90	0,69	0,84	3,10	2,75	0,83	1,29
16-methylheptadekanová	1,40	0,88	0,66	1,51	1,33	1,45	1,18	1,47
stearová	112,21	139,28	142,69	106,03	111,90	142,50	63,43	50,03
trans vacenová	2,08	1,47	1,51	2,46	1,32	1,50	1,83	1,25
olejová	81,55	15,92	5,62	10,73	6,57	6,63	8,47	4,96
vacenová	2,52	1,62	3,09	9,76	4,88	7,51	2,94	1,69
nonadekanová	3,06	4,32	2,71	3,53	2,92	2,56	3,34	2,04
linolová	29,53	17,16	29,20	18,78	20,37	25,76	32,86	21,30
gama-linolenová	0,94	0,81	1,24	0,74	0,59	1,17	0,79	0,91
arachidová	3,04	2,24	1,29	1,62	2,93	3,52	1,92	1,75
alpha-linolenová	1,68	1,24	1,12	1,11	1,02	1,17	1,21	1,28
oktadekadienová	2,07	5,84	2,95	4,05	1,33	1,58	4,50	3,65
oktadekadienová	8,04	27,26	3,25	3,79	2,57	2,35	4,55	6,11
stearidová	2,75	2,58	1,36	2,33	3,28	3,51	2,94	4,47
cis 8,11,14-eikosatrienová	0,86	0,73	1,07	1,01	0,93	1,02	0,66	0,99
behenová	1,81	2,50	1,46	1,25	1,57	1,95	1,85	1,42
arachidonová	1,98	1,60	0,75	1,04	1,38	1,67	1,21	2,19
eikosatetraenová	3,45	3,13	2,80	2,05	1,95	2,33	1,71	1,83
eikosapentaenová	42,27	38,63	47,24	46,10	67,08	58,19	55,00	55,14
lignocerová	26,52	16,37	35,17	31,20	41,58	40,28	26,03	22,77
dokosatetraenová	10,58	4,99	3,59	2,95	7,33	6,28	6,12	3,24
nervová	62,97	5,31	50,45	34,34	4,32	4,89	26,05	29,00
dokosapentaenová	2,88	1,27	1,34	1,63	1,52	1,23	2,07	3,71
dokosapentaenová	1,43	1,47	0,73	0,83	0,78	0,78	1,57	2,17
dokosahexaenová	1,52	0,67	1,32	1,13	1,25	1,91	1,43	3,19
cerotová	22,96	17,85	29,14	26,14	44,48	42,91	27,03	22,48
tetrakosatetraenová	1,24	0,75	0,73	0,72	1,69	1,26	0,83	1,16
tetrakosapentaenová	3,54	1,62	1,40	0,96	1,35	1,43	5,62	5,79
tetrakosapentaenová	1,65	1,72	1,46	1,72	1,94	2,62	1,78	1,82
tetrakosahexaenová	17,37	22,15	19,69	20,60	34,66	34,45	19,34	20,97
9-desaturáza	0,73	0,12	0,04	0,11	0,06	0,05	0,14	0,13
9-desaturáza x 100	0,85	0,87	0,73	1,05	1,68	1,97	1,43	1,68
elongáza x 100	67,58	100,65	59,21	51,85	71,28	92,02	56,51	59,18
5-desaturáza	2,67	2,41	0,70	1,07	1,50	1,85	1,98	2,17
6-desaturáza x 100	3,05	4,27	3,72	5,54	4,68	3,96	2,10	4,80
de novo lipogeneze	5,76	8,09	8,48	11,24	8,32	6,17	4,01	4,57

Příloha C – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce DG – věkové skupiny, pohlaví*

frakce DG								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71 +**	
kyselina, enzymy	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**
12-methyltridekanová	0,61	1,67	1,60	1,28	1,79	1,17	1,39	1,60
myristová	4,32	5,17	4,82	5,86	7,64	6,19	4,99	5,63
13-methylmyristová	0,31	4,01	2,36	0,44	1,00	1,05	0,40	0,56
12-methyltetradekanová	2,85	3,08	2,58	2,27	3,38	2,38	1,63	2,62
pentadekanová	2,36	4,07	3,50	3,28	6,53	4,90	1,64	1,97
palmitová	140,08	132,35	124,39	120,21	119,75	124,19	58,44	106,37
*trans*palmitoolejová	0,35	0,44	0,46	0,39	0,53	0,42	0,25	0,34
sapienová	4,32	8,12	9,93	4,56	16,16	12,87	4,38	4,72
cis palmitoolejová	1,24	1,41	0,62	0,68	1,13	1,57	2,70	0,80
14-methylhexadekanová	2,26	2,13	1,41	1,26	1,00	1,34	1,47	1,27
heptadekanová	1,16	0,73	0,52	0,98	0,68	0,94	0,65	0,79
16-methylheptadekanová	0,70	1,07	1,11	0,90	1,37	0,75	0,82	0,92
stearová	85,07	95,92	65,81	60,79	64,71	63,62	44,15	78,96
trans vacenová	1,31	0,91	0,52	0,54	0,90	0,96	0,75	0,68
olejová	26,60	16,21	11,96	13,14	7,36	6,35	5,55	5,06
vacenová	3,71	5,93	2,47	3,61	3,51	3,25	1,95	1,77
nonadekanová	3,40	4,17	7,26	2,48	2,50	2,57	3,72	2,49
linolová	15,27	6,22	5,61	6,35	3,78	2,87	4,39	5,60
gama-linolenová	0,76	0,95	0,74	1,23	4,27	3,38	1,18	1,64
arachidová	2,95	2,88	1,71	1,56	1,18	1,18	2,04	1,41
alpha-linolenová	1,51	1,92	1,35	1,52	2,05	2,58	1,80	1,43
oktadekadienová	2,16	4,71	2,89	2,46	2,33	2,38	2,52	2,23
oktadekadienová	7,69	6,17	7,19	8,41	6,33	6,70	4,70	7,90
stearidová	2,37	4,28	1,64	1,75	1,57	2,42	1,80	2,48
cis 8,11,14-eikosatrienová	0,39	0,96	0,69	0,48	0,52	0,55	0,57	0,76
behenová	0,56	0,92	1,16	0,87	0,86	0,81	0,72	0,94
arachidonová	0,29	2,26	2,37	2,44	1,86	1,45	2,35	2,23
eikosatetraenová	3,16	1,33	1,55	2,34	0,91	0,91	0,86	1,22
eikosapentaenová	21,82	19,15	16,14	14,94	18,89	16,64	13,79	12,78
lignocerová	9,09	3,15	7,33	6,48	7,80	6,95	6,16	5,78
dokosatetraenová	4,71	3,56	1,68	1,68	1,24	0,86	1,45	1,58
nervová	3,92	2,45	1,12	1,22	1,10	3,61	1,45	2,26
dokosapentaenová	1,38	0,53	0,57	0,31	0,77	0,70	0,57	0,77
dokosapentaenová	0,92	0,38	0,32	0,31	0,83	1,08	0,53	0,53
dokosahexaenová	0,50	0,76	0,50	0,63	0,54	0,56	0,54	0,69
cerotová	4,89	3,40	5,60	5,74	6,72	7,84	5,02	5,60
tetrakosatetraenová	0,55	0,70	0,67	0,57	0,63	0,68	0,56	0,62
tetrakosapentaenová	1,41	0,74	0,54	0,61	1,22	1,24	1,14	1,39
tetrakosapentaenová	1,64	2,31	1,43	1,62	1,60	1,76	1,51	1,57
tetrakosahexaenová	3,22	2,02	3,51	3,00	2,68	2,73	3,36	2,84
9-desaturáza	0,31	0,17	0,18	0,22	0,12	0,10	0,14	0,07
9-desaturáza x 100	0,88	1,06	0,50	0,58	0,95	1,28	4,98	0,81
elongáza x 100	60,86	73,04	53,05	51,75	54,00	51,54	78,61	72,44
5-desaturáza	0,78	2,35	4,02	5,45	3,82	2,87	4,88	4,67
6-desaturáza x 100	2,79	15,36	13,61	7,73	14,36	20,34	13,43	14,38
de novo lipogeneze	9,80	21,36	24,57	20,04	32,49	44,51	14,21	19,70

Příloha D – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce FFA – věkové skupiny, pohlaví*

Frakce FFA								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71 +**	
kyselina, enzymy	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**
12-methyltridekanová	1,60	0,83	2,51	3,13	1,56	1,56	2,11	1,23
myristová	93,09	2,55	9,42	5,47	142,67	128,83	11,62	12,89
13-methylmyristová	4,02	0,25	1,39	1,34	17,66	21,56	1,64	1,76
12-methyltetradekanová	2,59	1,26	2,75	2,94	3,48	3,34	5,90	2,13
pentadekanová	58,17	3,32	5,91	4,75	142,31	99,68	18,25	7,04
palmitová	713,88	48,30	238,64	191,95	637,98	714,26	135,50	98,03
*trans*palmitoolejová	1,62	0,40	1,46	1,60	1,66	1,94	0,90	1,73
sapienová	40,10	14,58	9,06	37,10	23,73	26,01	38,27	24,82
cis palmitoolejová	6,91	1,33	2,00	2,64	2,01	2,79	1,97	1,47
14-methylhexadekanová	6,04	11,43	2,19	3,62	5,35	7,90	5,58	2,43
heptadekanová	1,23	0,68	1,09	1,06	2,39	2,41	2,33	1,17
16-methylheptadekanová	2,29	1,14	1,21	1,50	4,06	4,73	1,39	1,16
stearová	144,97	30,11	61,68	63,82	122,60	119,52	39,96	49,40
trans vacenová	2,59	2,42	1,98	1,66	1,76	1,15	1,85	1,19
olejová	199,66	23,35	4,73	29,55	129,84	115,25	32,22	21,91
vacenová	11,03	4,99	13,63	18,68	29,43	26,84	16,12	7,32
nonadekanová	10,35	2,12	4,12	5,76	5,79	3,74	5,89	4,10
linolová	72,54	0,63	19,93	21,73	39,78	39,80	13,81	35,21
gama-linolenová	0,82	0,39	1,09	1,10	2,26	2,22	0,88	1,02
arachidová	2,77	1,06	6,54	5,20	6,95	6,35	2,24	2,51
alpha-linolenová	2,56	1,63	1,56	1,63	2,51	2,28	1,08	1,08
oktadekadienová	4,58	5,46	3,34	4,31	22,41	29,00	19,28	5,11
oktadekadienová	14,50	12,46	7,15	12,81	27,30	25,04	30,97	12,06
stearidová	5,15	1,47	4,36	5,03	5,79	6,80	26,22	2,32
cis 8,11,14-eikosatrienová	1,30	0,57	1,24	1,17	2,87	3,23	0,99	1,81
behenová	3,56	1,34	2,75	2,14	3,27	3,05	1,81	4,21
arachidonová	3,02	0,72	4,58	4,09	7,28	8,16	3,65	3,10
eikosatetraenová	6,03	3,81	1,83	2,15	5,44	5,16	2,21	1,35
eikosapentaenová	88,25	59,53	128,38	99,59	28,25	49,93	56,25	71,65
lignocerová	44,11	30,83	20,46	18,95	22,54	28,71	8,59	7,36
dokosatetraenová	2,99	3,11	2,86	2,25	3,20	3,60	3,34	1,83
nervová	10,87	7,41	5,14	4,74	9,77	11,54	11,14	2,79
dokosapentaenová	1,43	0,47	2,10	2,65	1,79	2,35	5,86	2,10
dokosapentaenová	0,70	0,08	0,73	0,55	0,91	1,15	0,49	0,51
dokosahexaenová	0,77	0,43	1,15	1,12	1,99	1,84	0,74	1,06
cerotová	27,20	16,58	17,66	15,82	16,21	24,76	6,92	17,19
tetrakosatetraenová	1,26	0,68	1,02	1,47	2,04	2,57	0,55	1,09
tetrakosapentaenová	0,86	0,76	1,15	1,34	1,74	2,74	0,76	2,31
tetrakosapentaenová	2,33	1,43	2,32	2,33	2,12	1,89	1,36	1,35
tetrakosahexaenová	13,56	1,07	25,68	23,58	23,31	21,06	18,06	21,67
9-desaturáza	1,39	0,78	0,08	0,51	1,07	1,03	0,90	0,48
9-desaturáza x 100	0,97	2,72	0,85	1,39	0,32	0,40	1,58	1,77
elongáza x 100	20,36	62,76	26,48	34,67	19,33	16,98	31,51	52,47
5-desaturáza	2,46	1,34	3,76	3,82	2,58	2,67	3,72	1,94
6-desaturáza x 100	1,78	95,12	6,64	5,44	7,31	8,21	10,94	6,11
de novo lipogeneze	9,91	79,26	12,48	8,84	16,36	18,52	14,49	2,97

Příloha E – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce TAG– věkové skupiny, pohlaví*

Frakce TAG								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71 +**	
kyselina, enzymy	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**
12-methyltridekanová	8,31	0,60	2,83	3,62	5,23	4,09	7,22	6,61
myristová	12,99	4,81	6,22	8,44	12,08	15,19	5,97	5,36
13-methylmyristová	2,51	0,46	1,28	1,15	1,45	1,55	0,75	1,28
12-methyltetradekanová	24,98	0,90	25,18	15,59	17,81	21,21	12,14	11,80
pentadekanová	2,24	3,24	5,40	6,56	4,52	5,03	2,07	1,49
palmitová	138,15	63,27	217,70	225,76	145,83	115,10	64,50	84,29
*trans*palmitoolejová	1,40	0,56	0,96	1,23	1,12	1,05	0,98	1,11
sapienová	46,47	8,18	10,14	8,25	11,85	11,46	6,51	6,92
cis palmitoolejová	3,08	0,88	1,56	3,72	4,49	5,04	16,72	11,12
14-methylhexadekanová	1,59	0,81	1,10	1,34	1,34	1,32	0,70	0,68
heptadekanová	1,39	0,62	0,63	0,57	0,61	0,85	1,01	1,07
16-methylheptadekanová	1,54	0,46	1,53	2,31	1,35	1,42	1,20	1,18
stearová	53,25	28,25	41,36	51,72	43,21	38,52	3,29	4,06
trans vacenová	11,35	0,70	4,37	3,45	3,68	3,64	3,64	1,63
olejová	145,16	6,09	19,02	15,37	12,53	12,86	36,00	10,14
vacenová	66,80	16,51	26,67	31,95	29,98	30,36	4,17	4,13
nonadekanová	4,62	1,19	1,93	3,28	2,91	3,58	4,55	2,43
linolová	31,83	7,61	12,53	13,60	9,29	7,27	12,30	11,69
gama-linolenová	4,86	0,47	2,13	2,87	1,82	1,85	2,15	2,67
arachidová	6,60	1,69	13,07	34,91	4,15	5,31	3,19	2,16
alpha-linolenová	2,44	0,34	1,37	1,07	1,44	1,33	1,48	1,33
oktadekadienová	18,89	11,80	21,19	16,12	18,91	58,87	17,20	8,94
oktadekadienová	21,49	5,37	23,54	20,59	17,16	29,12	87,69	88,26
stearidová	5,39	1,24	5,71	6,46	2,54	2,23	6,49	1,95
cis 8,11,14-eikosatrienová	1,39	0,41	0,74	0,83	1,32	1,42	1,00	1,20
behenová	3,95	0,58	1,46	1,84	2,45	1,99	2,65	2,17
arachidonová	7,59	0,27	3,84	4,35	4,82	3,81	4,99	6,33
eikosatetraenová	3,64	0,78	1,44	1,74	1,25	1,23	1,76	1,49
eikosapentaenová	122,35	6,88	108,72	119,54	143,42	141,20	26,15	25,28
lignocerová	25,53	3,98	42,85	25,70	26,71	30,95	4,37	5,20
dokosatetraenová	3,12	0,53	1,93	1,66	1,72	1,29	1,85	0,80
nervová	6,74	5,42	2,60	2,83	13,13	8,12	3,19	2,34
dokosapentaenová	12,41	9,64	16,64	8,71	4,56	7,11	3,35	3,26
dokosapentaenová	1,39	0,38	0,83	0,97	1,26	1,40	1,38	1,08
dokosahexaenová	11,96	0,13	8,84	8,77	1,28	1,34	6,94	4,54
cerotová	1,47	1,24	1,89	1,52	1,50	1,56	1,28	1,15
tetrakosatetraenová	3,41	1,08	2,11	2,07	2,81	3,60	1,69	2,09
tetrakosapentaenová	4,73	0,51	4,52	3,78	5,82	7,16	5,07	4,94
tetrakosapentaenová	1,90	1,49	1,36	2,02	1,46	1,40	1,57	1,26
tetrakosahexaenová	10,36	1,95	15,44	17,93	20,72	25,88	6,75	3,23
9-desaturáza	2,72	0,22	0,47	0,32	0,31	0,34	11,00	2,74
9-desaturáza x 100	2,23	1,35	0,74	1,68	3,26	4,40	28,81	18,64
elongáza x 100	39,19	45,88	19,65	23,61	31,79	33,86	5,50	5,64
5-desaturáza	5,55	0,78	5,86	5,85	3,66	2,74	5,41	5,71
6-desaturáza x 100	4,40	5,90	5,92	6,78	14,91	19,86	53,82	10,94
de novo lipogeneze	4,35	8,61	17,71	17,51	16,64	16,28	43,74	7,42

Příloha F – *Průměrná koncentrace MK a enzymů u frakce EC – věkové skupiny, pohlaví*

Frakce EC								
věkové skupiny	**0 – 30**		**31 – 60**		**61 – 70**		**71 +**	
kyselina, enzymy	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**	**MUŽI $\bar{c}$ [µmol/l]**	**ŽENY $\bar{c}$ [µmol/l]**
12-methyltridekanová	1,33	0,76	1,71	1,32	1,47	1,12	1,45	0,73
myristová	2,59	2,45	4,14	4,89	26,37	13,45	6,38	4,33
13-methylmyristová	29,55	18,39	22,49	18,76	40,30	23,13	18,78	20,73
12-methyltetradekanová	1,38	0,75	0,55	0,53	1,36	0,56	0,60	0,50
pentadekanová	2,48	0,82	0,97	0,91	1,22	0,86	0,98	0,57
palmitová	74,88	65,78	54,39	46,26	131,43	55,98	64,67	35,59
*trans*palmitoolejová	8,97	3,23	28,35	28,04	57,72	19,52	30,47	14,91
sapienová	6,90	5,90	13,91	10,63	10,38	11,08	7,93	8,40
cis palmitoolejová	0,52	0,51	0,98	0,88	4,62	0,99	0,48	0,46
14-methylhexadekanová	0,33	0,44	0,75	0,42	1,01	0,60	0,33	1,18
heptadekanová	1,42	2,79	1,55	1,70	4,71	1,93	3,67	1,25
16-methylheptadekanová	0,90	0,84	1,01	0,75	1,06	0,97	0,78	0,66
stearová	1,08	0,80	1,53	1,36	1,40	1,91	1,40	1,25
trans vacenová	141,68	35,32	50,87	47,46	77,39	54,79	104,62	84,08
olejová	5,23	1,35	4,94	6,48	4,97	2,51	5,57	2,91
vacenová	3,08	3,16	3,87	3,29	9,99	3,78	3,61	3,49
nonadekanová	36,66	24,59	22,51	25,38	32,25	22,48	61,33	52,47
linolová	1,01	0,38	1,09	0,83	0,86	0,68	0,66	0,86
gama-linolenová	0,65	0,72	1,29	0,94	3,70	1,39	0,75	0,83
arachidová	0,76	0,93	5,32	4,62	1,85	0,82	1,60	1,14
alpha-linolenová	1,34	1,92	2,10	1,84	2,33	2,16	3,51	1,43
oktadekadienová	5,07	2,18	20,93	17,12	4,13	3,10	2,93	0,78
oktadekadienová	44,34	75,94	26,58	30,46	56,90	48,00	33,00	4,81
stearidová	15,93	2,96	1,54	1,57	2,08	7,41	3,82	1,71
cis 8,11,14-eikosatrienová	1,71	1,16	6,55	5,44	0,90	0,41	0,28	0,20
behenová	2,12	3,49	4,42	3,49	18,36	7,16	4,78	2,56
arachidonová	2,53	0,84	2,44	2,04	14,46	1,99	3,35	1,28
eikosatetraenová	22,94	1,52	3,73	3,29	3,37	1,28	2,24	1,12
eikosapentaenová	12,59	6,53	24,23	24,27	44,05	10,86	11,10	6,25
lignocerová	3,85	0,83	6,01	6,28	6,33	2,37	4,04	2,77
dokosatetraenová	1,53	0,95	1,17	1,03	2,64	0,95	0,93	0,87
nervová	16,28	5,48	24,81	27,34	42,32	14,76	25,20	33,27
dokosapentaenová	5,50	5,29	4,70	5,05	5,04	5,66	4,53	3,90
dokosapentaenová	0,31	0,30	0,25	0,35	0,61	0,28	0,39	0,28
dokosahexaenová	1,97	0,57	0,95	0,69	4,45	0,74	0,82	0,49
cerotová	3,54	0,60	3,48	3,29	2,16	0,71	1,41	0,60
tetrakosatetraenová	18,74	4,79	13,76	14,34	5,69	3,04	13,02	8,14
tetrakosapentaenová	2,12	1,32	1,33	1,20	1,16	2,15	1,16	1,02
tetrakosapentaenová	0,56	0,50	0,39	0,35	0,48	0,30	0,33	0,34
tetrakosahexaenová	1,34	1,21	1,60	1,14	1,42	1,19	1,54	0,86
9-desaturáza	4,87	1,69	3,51	4,85	3,90	1,48	4,02	2,31
9-desaturáza x 100	0,69	0,78	1,82	1,94	3,59	1,74	0,81	1,33
elongáza x 100	1,44	1,21	2,79	2,99	1,08	3,52	2,31	3,62
5-desaturáza	1,48	0,75	0,39	0,39	20,95	4,83	16,18	8,86
6-desaturáza x 100	172,30	314,51	636,90	663,21	117,08	61,12	47,44	22,68
de novo lipogeneze	77,04	175,55	54,06	56,60	181,01	85,25	103,39	45,45