

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza mastných kyselin ve vzorcích placenty
Diplomová práce

2023

Bc. Veronika Hnojská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Hnojská**
Osobní číslo: **C21448**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Analýza mastných kyselin ve vzorcích placenty**
Téma práce anglicky: **Analysis Of Fatty Acids In The Placenta**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte rešerši a prostudujte literární údaje o kvalitativním složení lipidů v placentě a o metodikách jejich kvantitativního stanovení.
2. Vybranou analytickou metodou stanovte hladiny mastných kyselin v placentě, porovnejte experimentální referenční hodnoty fyziologických a patologických vzorků.
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: **Ing. Martina Špryncová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza mastných kyselin ve vzorcích placenty 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.

V Pardubicích dne 5.5.2023

Bc. Veronika Hnojská, v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji za odborné vedení při zpracování diplomové práce paní Ing. Bc. Martině Špryncové, Ph.D. a konzultantovi panu prof. Ing. Alexanderovi Čeganovi, CsC. Děkuji za trpělivost a čas, který mi paní doktorka věnovala, stejně tak jako za poskytnutou pomoc a rady při laboratorní práci a konzultacích spojených se psáním diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala rodině za trpělivost a podporu při zpracovávání diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce se zaměřuje na analýzu mastných kyselin ve fyziologických a patologických vzorcích placenty. Patologické vzorky pochází od žen, u nichž došlo ke spontánnímu potratu z neznámých příčin. Cílem práce bylo zaměřit se na vybrané mastné kyseliny, které mohou být významné jak klinicky, tak statisticky a porovnat koncentrace mezi vzorky patologickými a fyziologickými (zdravé kontroly).

Vzorky placentární tkáň byly zhomogenizovány a rozděleny do pěti lipidových frakcí pomocí tenkovrstvé chromatografie. Posléze došlo k převedení na methylestery mastných kyselin a analýze plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem.

KLÍČOVÁ SLOVA

Placenta, mastné kyseliny, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, potrat

TITLE

Analysis Of Fatty Acids In The Placenta

ANNOTATION

The diploma thesis focuses on the analysis of fatty acids in physiological and pathological placental samples. The pathological samples come from women who had spontaneous abortion for unknown reasons. The aim of this thesis was to focus on selected fatty acids that may be clinically and statistically significant and compare the concentration between pathological and physiological samples (healthy controls).

Placental tissue samples were homogenized and separated to five lipid fractions using thin-layer chromatography. Afterwards, they were converted to fatty acid methylesters and analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector.

KEYWORDS

Placenta, fatty acids, gas chromatography, thin-layer chromatography, miscarriage

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ.....	10
SEZNAM ZKRATEK	12
Úvod	16
1 Teoretická část.....	17
1.1 Placenta.....	17
1.1.1 Stavba placenty	17
1.1.2 Vývoj placenty	18
1.1.3 Patologie placenty.....	20
1.1.3.1 Poruchy placentace	20
1.1.3.2 Velikost a tvar placenty	20
1.2 Lipidy.....	21
1.2.1 Mastné kyseliny	21
1.2.1.1 Dělení mastných kyselin.....	22
1.2.1.2 Nasycené mastné kyseliny	22
1.2.1.3 Nenasycené mastné kyseliny	22
1.2.1.4 Mononenasycené mastné kyseliny.....	23
1.2.1.5 Polynenasycené mastné kyseliny.....	23
1.2.1.6 Význam polynenasycených mastných kyselin v těhotenství.....	23
1.2.1.7 Imunomodulace	24
1.2.1.8 Komplikace v těhotenství	26
1.2.2 Metabolismus mastných kyselin.....	28
1.2.2.1 Odbourávání mastných kyselin.....	28
1.2.2.2 Biosyntéza mastných kyselin.....	29
1.2.3 Přenos mastných kyselin.....	30
1.2.3.1 Placentární lipázy.....	31
1.2.3.2 Transportní proteiny	31
1.2.3.3 FATP.....	31
1.2.3.4 FAT/CD36	32
1.2.3.5 pFABPpm	32
1.2.3.6 MFSD2a.....	32

1.2.3.7	PPAR	32
1.3	Chromatografie	33
1.3.1	Plynová chromatografie	35
1.3.1.1	Kolony na analýzu plynovou chromatografií	36
1.3.1.2	Detektory v plynové chromatografii	37
1.3.2	Analýza mastných kyselin	38
1.3.2.1	Příprava vzorků	39
1.3.2.2	Extrakce	39
1.3.3	Derivatizace mastných kyselin	40
1.3.3.1	Kyselá derivatizace	40
1.3.3.2	Bazická derivatizace	41
1.3.3.3	Diazomethan	41
2	Experimentální část	42
2.1	Seznam chemikálií	42
2.2	Seznam přístrojů a pomůcek	43
2.3	Postup práce	44
2.3.1	Příprava vzorků	44
2.3.2	Příprava standardu pro kalibrační křivku	44
2.3.3	Denaturace bílkovin a extrakce lipidů	45
2.3.4	Tenkvrstvá chromatografie	45
2.3.5	Derivatizace – převedení na methylestery	47
2.3.6	Plynová chromatografie	47
3	Výsledky	48
3.1	Kalibrační křivka	49
3.2	Frakce fosfolipidů	49
3.3	Frakce diacylglycerolů	51
3.4	Frakce volných mastných kyselin	52
3.5	Frakce triacylglycerolů	53
3.6	Frakce esterů cholesterolu	54
3.7	Aktivity desaturáz	55
3.8	Bodové grafy	56
3.8.1	Frakce fosfolipidů	56

3.8.2	Frakce diacylglycerolů.....	58
3.8.3	Frakce volných mastných kyselin.....	59
3.8.4	Frakce triacylglycerolů	60
3.8.5	Frakce esterů cholesterolu	61
4	Diskuze	62
	ZÁVĚR	69
	POUŽITÁ LITERATURA	71
5	Přílohy.....	78

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

OBRÁZKY

Obrázek 1: Stavba placenty [6]	18
Obrázek 2: Syntéza eikosanoidů [30].....	26
Obrázek 3: Schéma syntézy LCPUFA [40]	30
Obrázek 4: Schéma transportu MK buňkami syncytiotrofoblastu [46]	33
Obrázek 5: Pořadí eluce FAME na GC kolonách s různou polaritou [52]	36
Obrázek 6: Příprava chromatografické desky pro TLC	46
Obrázek 7: Vliv nerovnováhy n-6 a n-3 LCPUFA [65].....	66

TABULKY

Tabulka 1: Rozdělení chromatografických metod [49].....	34
Tabulka 2: Navážky vzorků placent	44
Tabulka 3: Seznam analyzovaných MK.....	48
Tabulka 4: Parametry kalibrační křivky.....	49
Tabulka 5: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci PL.....	78
Tabulka 6: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci PL.....	80
Tabulka 7: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci DG.....	82
Tabulka 8: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci DG.....	84
Tabulka 9: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci VMK.....	86
Tabulka 10: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci VMK	88
Tabulka 11: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci TG.....	90
Tabulka 12: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci TG	92
Tabulka 13: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci ECH	94
Tabulka 14: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci ECH	96

GRAFY

Graf 1: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci fosfolipidů.....	50
Graf 2: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci diacylglycerolů	51
Graf 3: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci volných mastných kyselin	52
Graf 4: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci triacylglycerolů.....	53

Graf 5: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci esterů cholesterolu.....	54
Graf 6: Průměrné aktivity $\Delta 9$ -desaturázy	55
Graf 7: Průměrné aktivity $\Delta 5$ -desaturázy	55
Graf 8: Průměrné aktivity $\Delta 6$ -desaturázy	56
Graf 9: Bodový graf závislosti DGLA (F) na DGLA (P).....	56
Graf 10: Bodový graf závislosti GLA (F) na DGLA (P).....	57
Graf 11: Bodový graf závislosti DHA (F) na EPA (P).....	57
Graf 12: Bodový graf závislosti ARA (F) na DGLA (P).....	58
Graf 13: Bodový graf závislosti EPA (F) na DHA (P).....	58
Graf 14: Bodový graf závislosti DGLA (F) na DGLA (P).....	59
Graf 15: Bodový graf závislosti DGLA (F) na ARA (P).....	59
Graf 16: Bodový graf závislosti ARA (F) na LA (P)	60
Graf 17: Bodový graf závislosti DGLA (F) na LA (P).....	60
Graf 18: Bodový graf závislosti DGLA (F) na GLA (P).....	61
Graf 19: Bodový graf závislosti ARA (F) na GLA (P)	61

SEZNAM ZKRATEK

ACP	protein přenářející acylové skupiny (z angl. acyl carrier protein)
ALA	kyselina α -linolenová (z angl. α -linolenic acid)
ARA	kyselina arachidonová (z angl. arachidonic acid)
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor (z angl. basic fibroblast growth factor)
CoA	koenzym A (z angl. coenzyme A)
COX	cyklooxygenáza (z angl. cyclooxygenase)
DG	diacylglyceroly
DGLA	kyselina dihomo- γ -linolenová (z angl. dihomo- γ -linolenic acid)
DHA	kyselina dokosaheptaenová (z angl. docosahexaene acid)
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DNA	kyselina deoxyribonukleová (z angl. deoxyribonucleic acid)
ECD	detektor elektronového záchytu (z angl. electron capture detector)
EET	kyselina epoxyeikosatrienová (z angl. epoxide eicosatrienoic acid)
EFA	esenciální mastné kyseliny (z angl. essential fatty acid)
ECH	estery cholesterolu
EL	endoteliální lipáza (z angl. endothelial lipase)
EPA	kyselina eikosapentaenová (z angl. eicosapentaene acid)
ER	endoplazmatické retikulum (z angl. endoplasmatic reticulum)
F	fyziologické
FABP	protein vázající mastné kyseliny (z angl. fatty acid-binding protein)
FAME	methylestery mastných kyselin (z angl. fatty acid methyl ester)
FAT	translokáza mastných kyselin (z angl. fatty acid translocase)
FATP	transportní protein mastných kyselin (z angl. fatty acid transport protein)
FDP	plamenový fotometrický detektor (z angl. flame photometric detector)
FID	plamenově ionizační detektor (z angl. flame ionization detector)
FVz	fyziologický vzorek
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GDM	gestační <i>diabetes mellitus</i>

GLA	kyselina γ -linolenová (z angl. γ -linolenic acid)
GLC	chromatografie plyn–kapalina (z angl. gas-liquid chromatography)
GSC	chromatografie plyn–pevná látka (z angl. gas-solid chromatography)
hCG	lidský choriový gonadotropin (z angl. human chorionic gonadotropin)
hCS	lidský choriový somatotropin (z angl. human chorionic somatomammotropin)
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (z angl. high density lipoprotein)
HETE	kyselina hydroxyeikosatetraenová (z angl. hydroxyeicosatetraenoic acid)
HEPE	kyselina hydroxyeikosapentaenová (z angl. hydroxyeicosapentaenoic acid)
HODE	kyselina hydroxyoktadekadienová (z angl. hydroxyoctadecadienoic acid)
HPETE	kyselina hydroperoxyeikosatetraenová (z angl. hydroperoxyeicosatetraenoic acid)
IDDM	inzulin–dependentní <i>diabetes mellitus</i> (z angl. insulin-dependent <i>diabetes mellitus</i>)
IL	interleukin
IS	interní standard
IUGR	intrauterinní růstová restrikce (z angl. intrauterine growth restriction)
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace (z angl. <i>in vitro</i> fertilization)
LA	kyselina linolová (z angl. linoleic acid)
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (z angl. long chain fatty acid)
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (z angl. low density lipoprotein)
LDLR	receptor pro lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. low density lipoprotein receptor)
LPL	lipoproteinová lipáza (z angl. lipoprotein lipase)
LT	leukotrien
LOX	lipooxygenáza (z angl. lipoxygenase)
MA	kyselina myristová (z angl. myristic acid)
MCFA	mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (z angl. medium chain fatty acid)

MF	mobilní fáze
MFSD2a	membránový transportér superrodiny domény 2a (z angl. major facilitator superfamily domain-containing protein 2)
MK	masné kyseliny
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
MUFA	mononenasycené masné kyseliny (z angl. monounsaturated fatty acid)
MVM	mikrovilózní membrána (z angl. microvillous membrane)
NA	kyselina nervonová (z angl. nervonic acid)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
NEFA	neesterifikované masné kyseliny (z angl. nonesterified fatty acid)
NPD	dusíkovo–fosforový detektor (z angl. nitrogen-phosphorus detector)
OA	kyselina olejová (z angl. oleic acid)
OP	opakované potraty
P	patologické
PA	kyselina palmitová (z angl. palmitic acid)
PCOS	syndrom polycystických ovárií (z angl. polycystic ovary syndrom)
PGD	prostaglandin D
PE	preeklampsie (z angl. preeclampsia)
pFABPpm	protein vázající masné kyseliny plazmatické membrány (z angl. plasmatic membrane placental fatty acid-binding protein)
PG	prostaglandiny (z angl. prostaglandins)
PGE	prostaglandin E
PGF	prostaglandin F
PGI	prostaglandin/prostacyklin I
PKC	proteinkináza C (z angl. proteinkinase C)
PL	fosfolipidy
PLA2	fosfolipáza A2 (z angl. phospholipase A2)
PLOT	kolona kryta vrstvou adsorbentu (z angl. porous layer open tubular columns)
POA	kyselina palmitoolejová (z angl. palmitooleic acid)

PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxizomů (z angl. peroxisome proliferator-activated receptors)
PPRE	responsibilní element (z angl. peroxisome proliferator response element)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (z angl. polyunsaturated fatty acid)
PVz	patologický vzorek
RXR	retinoidní receptor X (z angl. retinoid X receptor)
SA	kyselina stearová (z angl. stearic acid)
SCE	superkritická extrakce (z angl. supercritical extraction)
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z angl. short chain fatty acid)
SCOT	kolona kryta uvnitř tenkým filmem (z angl. support-coated open tubular columns)
SF	stacionární fáze
SFA	nasycené mastné kyseliny (z angl. saturated fatty acid)
SP	spontánní potrat
SPE	extrakce na pevné fázi (z angl. solid phase extraction)
TCD	tepelně vodivostní detektor (z angl. thermal conductivity detector)
TG	triacylglyceroly
TID	termoionizační detektor (z angl. thermal ionization detector)
TLC	tenkovrstevná chromatografie (z angl. thin-layer chromatography)
TNF	tumor nekrotický faktor (z angl. tumor necrosis factor)
TX	tromboxan
UFA	nenasycené mastné kyseliny (z angl. unsaturated fatty acid)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
VLCFA	mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (z angl. very long chain fatty acid)
VLDLR	receptor lipoproteinů o velmi nízké hustotě (z angl. very low density lipoprotein receptor)
VMK	volné mastné kyseliny
WCOT	kolona pokrytá tenkou vrstvou stacionární fáze (z angl. wall-coated open tubular columns)

Úvod

Diplomová práce se zaměřuje na analýzu vybraných mastných kyselin ve fyziologických a patologických vzorcích placentární tkáně pocházející od žen, u kterých došlo ke spontánnímu potratu z neznámých příčin.

Časné spontánní potraty jsou nejčastější komplikací v těhotenství. Přibližně 15 % všech těhotenství končí jeho ztrátou, a to v období prvního trimestru. Přes velké pokroky v technologii oplodnění *in vitro* je míra otěhotnění při IVF stále nízká (~25 %), a to především z důvodu neúspěšné implantace embrya. Opakované těhotenské ztráty, označované také jako opakované potraty, jsou definovány jako 3 po sobě jdoucí těhotenské ztráty před 20. týdnem od poslední menstruace. Epidemiologické studie však odhalují, že 1 až 2 % žen zažívá opakované potraty. Přes velké množství vyšetřovacích metod se na příčinu spontánního potratu až v polovině případů nepříjde, mezi možné důvody zařazujeme chromozomální abnormality, nekontrolovaný *diabetes mellitus*, imunologické abnormality, metabolické poruchy, infekce, faktory prostředí nebo endokrinní poruchy.

Placenta je orgán zodpovědný za přenos živin (mj. mastných kyselin) z matky k plodu. Mastné kyseliny (především polynenasycené mastné kyseliny) jsou důležitou strukturní a funkční součástí buněčných membrán, poskytují substráty pro tvorbu signálních molekul, jako jsou např. prostaglandiny, ovlivňují expresi genů zapojených do udržení buněčné homeostázy a podílí se na vytváření cévní sítě v placentě, která je důležitá pro růst a zachování vyvíjejícího se embrya. Prostaglandiny se podílejí na zvýšení vaskulární permeability, decidualizaci, růstu a vývoji blastocysty, transportu embrya, invazi trofoblastu a remodelaci extracelulární matrix během implantace.

1 Teoretická část

1.1 Placenta

Placenta je dočasný orgán, který vzniká v děložní stěně po početí. Dochází zde ke kombinaci mateřských a fetálních tkání, ale zároveň nedochází k promíchání krve matky a plodu (placentární bariéra). Placenta má zásadní roli ve zdraví plodu i matky, narušený vývoj placenty je hlavní příčinou závažných těhotenských komplikací, jako je intrauterinní růstová restrikce (IUGR), spontánní potrat nebo narození mrtvého plodu. [1]

Během vývoje plodu funguje placenta jako fetální, renální, respirační, jaterní a imunitní systém, zároveň dodává živiny plodu a je velmi důležitým endokrinním orgánem, produkující hormony (estrogen, progesteron, hCG - lidský choriový gonadotropin a hCS - lidský choriový somatotropin). Důležitou roli má placentární membrána, která je velmi tenká a umožňuje výměnu mezi krevním oběhem matky a plodu, chrání plod před většinou škodlivých látek, výjimkou jsou drogy, nikotin, alkohol, viry a chemikálie. [2]

Pro úspěšný vývoj těhotenství je důležité v placentě udržet imunitní toleranci matky vůči tkáním plodu. Začátek porodu je považován za zánětlivý proces, který je ovlivněn imunitně zprostředkovanou prozánětlivou reakcí vyvolanou různými hormonálními a mechanickými mechanismy (infekce, přetížení dělohy, stres nebo porucha tolerance mezi matkou a plodem). Imunologicky aktivní tkáň v děloze má významnou roli v mechanismu tolerance, umožňuje proangiogenní i prozánětlivé prostředí nezbytné pro úspěšný průběh těhotenství a reguluje buňky vrozené a adaptivní imunity (přirození zabíječi, makrofágy, neutrofilové a T regulační buňky). Nerovnováha v těhotenství mezi pomocnými T1 a T2 lymfocyty je spojována se spontánními potraty a předčasnými porody. [3]

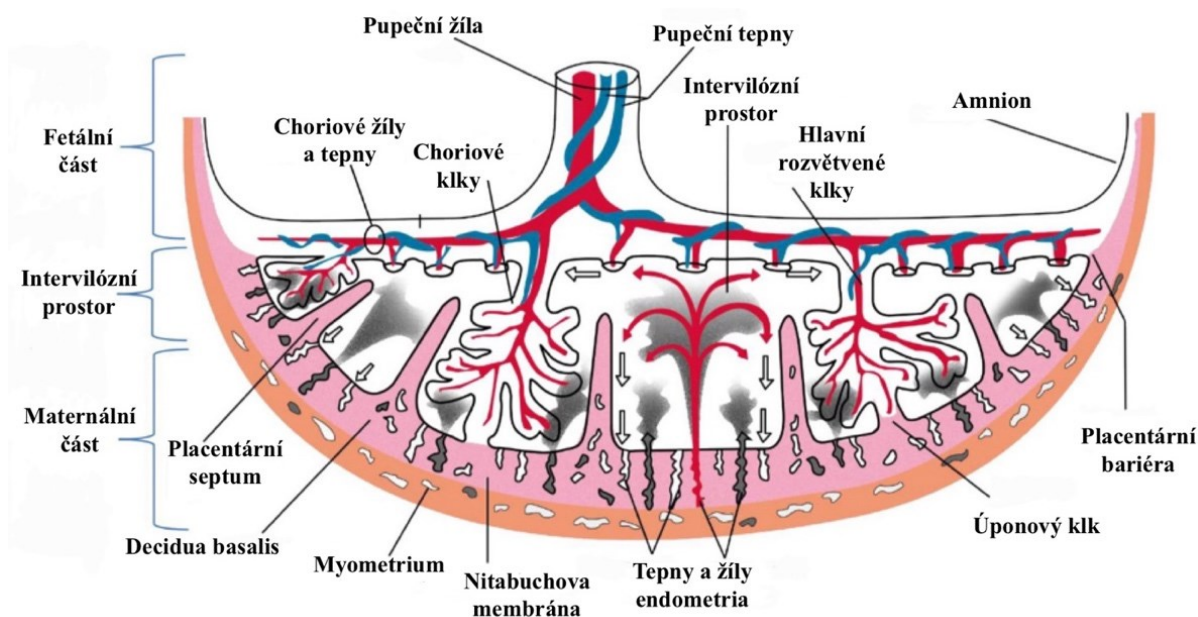
1.1.1 Stavba placenty

Placenta roste do 36.-38. týdne těhotenství, má tvar disku (*placenta discoidalis*), velikost v průměru 15-20 cm, tloušťku přibližně 2-3 cm a váží kolem 500 g. Placenta se skládá z mateřské části (*pars materna placentae*) tvořenou *decidua basalis* a částí fetální (*pars fetalis placentae*) tvořenou *chorionem frondosum*. Decidua má tři vrstvy: *decidua basalis* (v místě implantace), *decidua capsularis* (kryje plod) a *decidua parietalis* (zbylé části). [4]

Mateřská strana placenty je nerovná, má šedo-rudou barvu a houbovitou strukturu, na jejím povrchu lze rozeznat 15-20 kotydelonů, jež jsou oddělené placentárními septy

(deciduálními septy) vytvořenými deciduou v průběhu čtvrtého a pátého měsíce. Kotydelon je tvořen z 10 až 20 lobulů otevírajících se do intervilózního prostoru, lobuly odpovídají vývodům mateřských uteroplacentárních cév. [5]

Choriové klky, tvořící vlastní tkáň placenty, se rozvětvují z choriové desky a smáčejí se v intervilózním prostoru mateřskou krví. Intervilózní prostor je ohraničen na mateřské straně *deciduou basalis* a na straně fetální choriovou deskou. Krev z intervilózního prostoru je odváděna otvory odvodných mateřských vén v deciduální vrstvě a cirkulárními okrajovými sinusy (*sinus marginalis*). Spirální arterie matky perforují deciduální vrstvu, krev vtéká do intervilózního prostoru a omývá choriové klky odpovídající jedné větvi *arteria umbilicalis* (fetální lobulus), následně se vrací k *decidua basalis* a odtéká mateřskými věnami. Fetální část je hladká, krytá *amniem* (lesklá, modrošedá blána), pod kterým jsou rozvětvující se pupečnickové cévy. Cévy pokračují dále po choriové ploténce do periferie placenty, větví se do jednotlivých kotydelonů a jsou zakončeny v placentárních klcích. Amnion přechází na pupečník jako jeho obal, pupečník se na placentu upíná v její centrální i marginální části (viz **Obrázek 1**). [4]



Obrázek 1: Stavba placenty [6]

1.1.2 Vývoj placenty

Po oplození se vajíčko (zygota) opakovaným dělením vyvine v morulu (kulovitý shluk buněk), ze kterého se později tvoří placenta a embryo, oplozené vajíčko i morula jsou obklopené zónou *pellucida*. Morula přijímá tekutinu a vytváří blastocystu s vnitřní

ohraničenou buněčnou masou a vnější masou buněk. Vnitřní buněčná masa se označuje jako embryoblast, vnější buněčná masa jako trofoblast. Z trofoblastu je tvořena větší část placenty a fetální membrány, z embryoblastu se vyvíjí embryo, pupečník a placentární mezenchym. V endometriu dochází k deciduální reakci (decidualizaci), kdy se buňky zvětšují a obsahují více lipidů a glykogenu. Blastocysta se během 6. dne po oplození pomocí mikroklků a pinopodů uchytil svým embryonálním pólem k epitelu endometria. K endometriu se blastocysta také uchycuje pomocí integrinů a selektinů, zároveň blastocysta uvolňuje chemokiny, které toto spojení amplifikují. Trofoblast se diferencuje v cytotrofoblast (vnitřní vrstva s dobře odlišitelnými buňkami), syncytiotrofoblast (vnější vrstva skládající se z mnoha splynulých buněk původem z cytotrofoblastu) a začne rychle proliferovat a pronikat hlouběji do endometria, zároveň produkuje hCG. [7]

Postupující syncytiotrofoblast nahlodává vlasečnice děložní sliznice a krev se vylévá do trofoblastických lakun. Lakuny následně splývají v lakunární síť a dávají základ intervilózním prostorům, krev do lakun přivádí spirální arterie. Od 15. dne cytotrofoblast dosahuje do mateřské části placenty prorůstáním do syncytiotrofoblastu v prstovité výběžky, které se nazývají primární choriové klky. Primární choriové klky jsou brzy vyplňovány extraembryonálním mezodermem, který postupuje až k zakončením a vytvářejí se sekundární klky. Extraembryonální mezoderm se dělí na vnitřní somatický a vnější splachnický mezoderm, navzájem spojenými spojovací stopkou, ze které později vzniká pupečník. [8]

Klky se větví v intervilózním prostoru a absorbují živiny z mateřské krve a zároveň do ní odvádějí metabolity. V mesenchymálním jádru ze sekundárních klků vznikají krevní cévy plodu, následně se slučují a vytváří souvislé cévní kanálky. S vaskularizací se ze sekundárních klků stávají klky terciální. Na maternální straně je krev vedena do intervilózního prostoru z obloukových větví děložních spirálovitých arterií skrz otvory v bazální ploténce. Tok krve z arterií je pulsativní a pod mnohem vyšším tlakem, než je tlak v intervilózním prostoru. Odkysličená krev proudí umbilikálními arteriemi z plodu do placenty. Okysličená venózní krev je sbírána do tenkostěnných žilek, které vrací krev zpět do choriové ploténky a zde se pak sbíhají do umbilikální žíly, která vede krev pupečníkem do *ductus venosus* a odtud do *vena cava inferior* v blízkosti jejího vstupu do pravé síně. [5]

Klky mohou být úponové (pevně zakotvené) nebo bez upevněného zakončení volně plovoucí v intervilózním prostoru. Klky, které sousedí s *deciduou basalis* se zvětšují a roste i jejich počet (*chorion frondosum* - chorion klkatý), zatímco klky nacházející se proti *decidua*

capsularis degenerují. Po třech měsících zůstává tato plocha chorionu hladká a relativně bezcévná (*chorion laeve*). *Decidua capsularis* do čtyř a půl měsíce zmizí a *chorion laeve* se spojí s *decidua vera* protější strany. [9]

1.1.3 Patologie placenty

Odchytky placenty mohou z velké části zkomplikovat těhotenství a následný porod, mezi tyto abnormality řadíme anomálii v uložení placenty, ve tvaru a velikosti a anomálie choriových klků. [6]

Placenta praevia (vcestné lůžko) je stav, kdy se placenta nachází v dolní části dělohy a je charakterizovaný abnormálním vývojem placentární tkáně v těsné blízkosti vnitřní děložní branky nebo jejím úplným zakrytím. Podle místa implantace placenty v děloze se *placenta praevia* dělí na dva hlavní typy: *major placenta praevia*, kde placentární tkáň kryje vnitřní branku buď úplně, nebo částečně a *minor placenta praevia*, kdy placenta částečně kryje vnitřní branku, ale nezakryje ji. Na začátku těhotenství není tento stav obvykle problém, ten nastává v pozdější fázi, kdy tento stav může způsobit vážné krvácení a komplikace. [10]

1.1.3.1 Poruchy placentace

Spektrum poruch placentace, také označovaných jako abnormálně invazivní placenta, popisuje stav, kdy se placenta po porodu spontánně neoddělí a nelze ji násilně odstranit, aniž by došlo k masivnímu a potenciálně život ohrožujícímu krvácení. Defekt na rozhraní endometria a myometria vede k selhání normální deciduální vrstvy, což způsobuje abnormálně hlubokou infiltraci trofoblastu. Podle hloubky invaze trofoblastu do myometria se rozlišují tři varianty: *placenta accreta* (také nazývaná *placenta creta*, *vera* nebo *adherenta*), kdy se choriové klky uchycují přímo na povrch myometria v nepřítomnosti deciduální vrstvy, *placenta increta*, kde choriové klky pronikají hluboko do myometria a dosahují vnější vrstvy a *placenta percreta*, kde invazivní choriové klky zasahují a pronikají skrz děložní serózu. [11]

1.1.3.2 Velikost a tvar placenty

K patologickým stavům může docházet také změnou tvaru nebo velikosti placenty. Jednou z variant je rozdělení placenty membránou na více laloků: *placenta biloba*, *triloba*, *multiloba* nebo na dva stejně velké laloky (*placenta bipartita*). [4]

Přídavné lůžko (*placenta succenturiata*) je stav, kdy se kromě hlavního placentárního vyvíjí jeden nebo více přídavných laloků, ke kterému je obvykle spojují pouze cévy. Jde

o menší variantu dvoulaločné placenty (*placenta bipartita*). Cévy jsou podporovány pouze komunikujícími membránami. Pokud komunikující membrány nemají cévy, nazývá se stav *placenta supuria*. [12]

Extrachoriální placenta prstencovitého tvaru se zvýšenými okraji složenými z dvojitého záhybu chorionu, amnionu, degenerované deciduy a fibrinových depozit se označuje jako *placenta circumvallata*. [13]

Vzácnou placentární abnormalitou je *placenta membranacea*, kdy placenta při vývoji nenachází deciduální endometrium, rozrůstá se do šířky, je tenčí a nápadně velká. [14]

Stav, kdy centrální část diskoidní placenty chybí, označujeme jako *placenta fenestrata*. Vzácně může být v placentě skutečný otvor, ale častěji se defekt týká vilózní tkáně a choriová ploténka zůstává intaktní. [12]

1.2 Lipidy

Lipidy jsou heterogenní skupina hydrofobních organických látek, které mohou být extrahovány z tkáně nepolárními rozpouštědly. Lipidy jsou pro lidské tělo zdrojem energie, ovlivňují permeabilitu buněčných membrán a chrání vnitřní orgány. Lipidy mají také další doplňující funkce v těle, např. některé v tucích rozpustné vitamíny mají regulační nebo koenzymatickou funkci, steroidní hormony mají důležitou roli v udržení homeostázy. Deficience nebo nerovnováha v metabolismu lipidů přispívá k mnoha klinickým problémům (ateroskleróza, obezita). Hlavními složkami lipidů v těle jsou mastné kyseliny (MK), do lipidů můžeme zařadit např. triacylglyceroly (TG), cholesterol, estery cholesterolu (ECH) nebo fosfolipidy (PL). Tyto složky mohou být dodávány potravou, nebo také syntetizovány v buňce a později být využity k výrobě energie nebo přeměně na jiné biologicky důležité látky. [15]

1.2.1 Mastné kyseliny

MK jsou karboxylové kyseliny, které mají na jednom konci methylovou skupinu a na druhém skupinu -COOH. MK se vyskytují jako volné mastné kyseliny (VMK) nebo jako součást lipidů. Amfipatická povaha MK většinou určuje jejich vazbu na albumin. Rozpustnost MK klesá s délkou řetězce a dobře se rozpouští v nepolárních činidlech. [16]

1.2.1.1 Dělení mastných kyselin

MK lze rozdělit podle několika kritérií: délky řetězce, počtu dvojných vazeb, struktury řetězce a podle toho, zda si tělo dokáže danou mastnou kyselinu syntetizovat nebo jestli je nutný její příjem v potravě. [17]

Dle délky řetězce se dělí na MK s krátkým řetězcem (SCFA, C2-C4), se středně dlouhým řetězcem (MCFA, C8-C12), s dlouhým řetězcem (LCFA, C14-C18) a s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA, > C18). Podle přítomnosti dvojných vazeb se dělí MK na nasycené (SFA, bez dvojných vazeb) a nenasycené (UFA, přítomnost alespoň jedné dvojných vazby), které se dále dělí na mononenasycené (MUFA, obsahující jednu dvojnou vazbu) a polynenasycené (PUFA, obsahující více dvojných vazeb). Podle struktury řetězce lze rozdělit MK na lineární a rozvětvené. [16]

1.2.1.2 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny jsou rozvětvené i nerozvětvené struktury, obvykle se sudým počtem atomů uhlíku a neobsahující žádnou dvojnou vazbu. SFA se rozděluje opět podle délky řetězce na krátké a dlouhé a jsou známy spíše svými triviálními názvy. Nejběžnější SFA mají obvykle 12 až 22 uhlíků. Najdeme je především ve výrobcích živočišného původu (uzeniny, máslo, sádlo, tučné maso a mléčné výrobky). Vyskytovat se mohou také v rostlinných tucích a tzv. tropických tucích jakými jsou palmový a kokosový. SFA s nízkým počtem atomů uhlíku mají velmi dobrou vstřebatelnost, jelikož se skrze střevní stěnu dostávají prostou difúzí. [18]

Konzumace stravy s vysokým obsahem nasycených tuků je spojena se špatně kontrolovanou hyperglykemií, hyperinzulinémií a inzulinovou rezistencí (charakteristické pro *diabetes mellitus* 2. typu a gestační *diabetes mellitus*), tyto stavy jsou spojeny až s pětinasobně zvýšeným rizikem úmrtí kojence. Hyperglykémie, hyperinzulinémie a inzulinová rezistence zároveň zvyšují oxidační stres, který ovlivňuje buněčné signální dráhy související s vývojem plodu. [19]

1.2.1.3 Nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené mastné kyseliny obsahují více dvojných vazeb. Mezi PUFA/esenciální (EFA) MK řadíme kyselinu linolovou (LA, C18:2 n-6) patřící do skupiny n-6 MK a kyselinu α -linolenovou (ALA, C18:3 n-3) patřící do skupiny n-3 MK. Tyto EFA fungují jako

prekurzory pro další MK, jmenovitě od LA kyselina γ -linolenová (GLA, C18:3 n-6), dihomo- γ -linolenová (DGLA, C20:3 n-6) a arachidonová (ARA, C20:4 n-6) a od ALA kyselina eikosapentaenová (EPA, C20:5 n-3) kyselina dokosaheptaenová (DHA, C22:6 n-3). [20]

U nenasycených MK existuje přítomnost dvojně vazby v izomerii *cis* nebo *trans*. Většina nenasycených MK má dvojnou vazbu v *cis*-konfiguraci, která je významná pro prostorové uspořádání molekul lipidů v buněčných membránách. [19]

1.2.1.4 Mononenasycené mastné kyseliny

Mononenasycené mastné kyseliny najdeme v běžně používaných potravinách jako je např. olivový a řepkový olej a většina ořechů. Zástupcem n-9 je kyselina olejová (OA, C18:1 n-9) nebo palmitoolejová (POA, C16:1 n-7). Studie u zvířat prokazují ochranné účinky příjmu MUFA, kdy u březích samic s hypercholesterolémií, kterým byla podávána dieta s vysokým obsahem n-9 MUFA, byl zjištěn ochranný účinek vůči steatohepatidě. Zdá se tedy, že MUFA přináší potomkům během vývoje a laktanční fáze zdravotní benefity prostřednictvím stimulace termogenního efektu a změn v jaterním metabolismu. [21]

1.2.1.5 Polynenasycené mastné kyseliny

N-3 mastné kyseliny jsou součástí buněčných membrán, mají vliv na srážení krve, kontrakce a relaxaci stěn cév. Mají také funkci při zánětu nebo při prevenci a léčbě obezity, metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění. Poměr n-3/n-6 PUFA by měl být ve prospěch n-3 PUFA, kdy dochází ke změnám v přeměně ALA na EPA (a následně DHA), jelikož ALA i LA soutěží o stejné desaturázy ($\Delta 5$ a $\Delta 6$) a elongázy. Při stravě bohaté na n-6 MK a chudé na n-3 MK dochází k dysbalanci mezi těmito kyselinami, což může mít za následek zvýšení incidence onemocnění srdce, DM, artritidy, těhotenských komplikací. [22]

1.2.1.6 Význam polynenasycených mastných kyselin v těhotenství

N-3 a n-6 MK jsou důležité pro implantaci embrya, vývoj placenty, imunomodulaci, vývoj mozku plodu, růst plodu a začátek porodu. V počátku těhotenství se placenta vyvíjí jako rozsáhlá síť cév, která musí předcházet organogenezi vyžadující průtok krve a živin. Ze studií vyplývá, že v počátcích těhotenství se v mateřské plazmě a erytrocytech nacházejí vysoké hladiny ARA a DHA, a to bez ohledu na potravu matky. Tento stav je pravděpodobně způsoben mobilizací tukových zásob matky k uvolňování DHA a ARA, které slouží

k proliferaci a diferenciaci tkání. V tomto období jsou požadavky plodu na EFA, zejména ARA a DHA, značně zvýšené a jsou závislé na dostupnosti EFA v oběhu matky. Studie ukazují, že placentární tkáň obsahuje vysoký podíl membránových fosfolipidů (80-90 % celkových MK), zejména ARA, které podporují organogenezi a vaskularizaci. [23]

DHA má velmi důležitou roli ve stádiu vývoje lidského mozku, jakými jsou proliferace, migrace, diferenciaci neurálních buněk a tvorba synapsí. Mozek využívá nejen n-3 DHA, ale i n-6 ARA. Tyto dvě MK tvoří přibližně čtvrtinu celkového obsahu MK v mozku. Jsou převážně integrovány ve formě fosfolipidů a jsou hlavními strukturními složkami buněčných membrán neuronů, naopak gliové buňky jsou bohaté na ARA. Nerovnováha v tomto vysoce specifickém složení lipidů má vliv na neurogenezi a konektivitu. Ze studií vyplývá, že DHA se akumuluje v částech mozku spojených s učením a pamětí. Mnoho poruch (např. dyslexie, porucha autistického spektra, pozornosti s hyperaktivitou) je spojeno se sníženou hladinou DHA. [24]

1.2.1.7 Imunomodulace

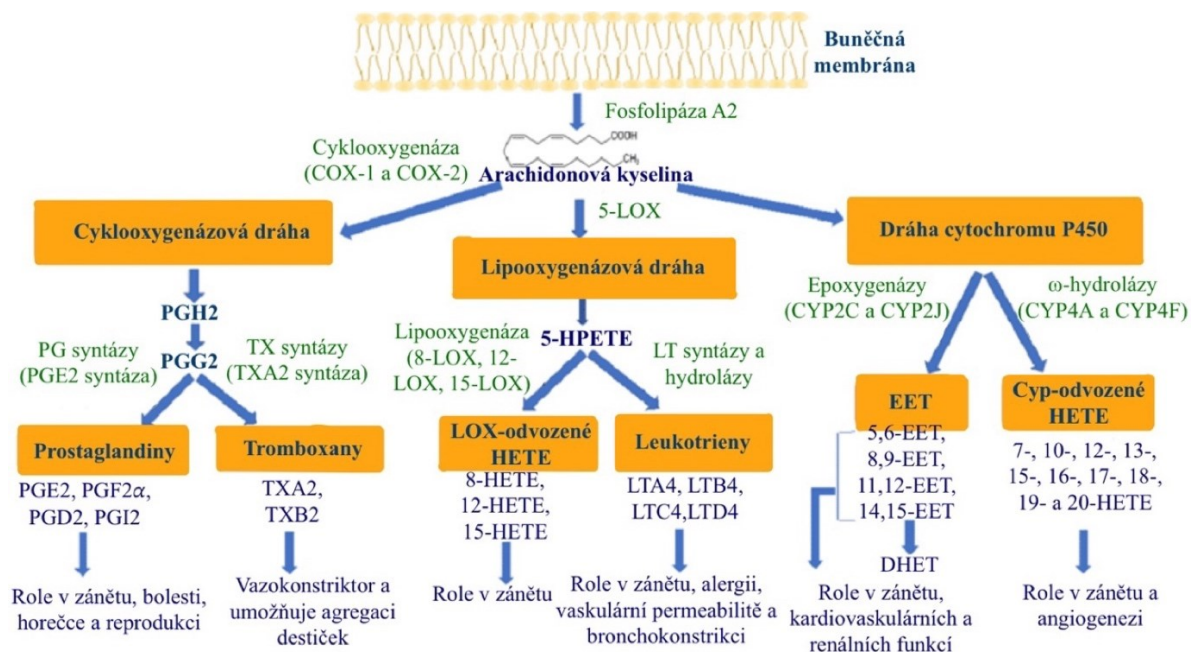
Jak n-3, tak i n-6 LCPUFA hrají klíčovou roli v modulaci imunitní odpovědi, jelikož jsou prekurzory eikosanoidů (regulátory zánětu). Díky své přístupnosti ve fosfolipidech buněk je ARA jedním z hlavních substrátů pro syntézu eikosanoidů. Eikosanoidy se dělí na prostaglandiny (PG), leukotrieny (LT) a tromboxany (TX). [25]

Během těhotenství je v nitroděložních tkáních placenta hlavním zdrojem PG. PG působí prostřednictvím vazby na receptory spojené s G-proteinem (GPCR) a zahrnují čtyři podtypy receptorů PGE (prostaglandin E), PGF (prostaglandin F) receptor, PGI₂ (prostaglandin/prostacyklin I) receptor a dva receptory PGD₂ (prostaglandin D). PG jsou syntetizovány pomocí enzymu cyklooxygenázy (COX) a mají nezastupitelnou roli při implantaci embrya. Podílejí se na zvýšení vaskulární permeability, decidualizaci, růstu a vývoji blastocysty, transportu embrya, invazi trofoblastu a remodelaci extracelulární matrix během implantace. Porušená syntéza PG vede k selhání implantace. Rozlišují se dvě izoformy enzymu COX (COX-1 a COX-2). COX-1 se podílí na základních fyziologických funkcích, jako je kontrola agregace krevních destiček, zatímco COX-2 se podílí především na zánětu a patofyziologických procesech. Metabolismus LA (pomocí enzymů LOX) vede ke vzniku hydroxyoktadekadienových kyselin (HODE). [26]

PGE2 a LT řady 4 mají prozánětlivé účinky, např. zvyšují produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α (tumor nekrotizující faktor α), IL-1, IL-6 (interleukin 1 a 6). V důsledku toho je inhibice metabolismu ARA dlouhodobě cílenou terapií u mnoha zánětlivých onemocnění. Ačkoli je dlouhodobě rozšířená představa, že eikosanoidy odvozené od ARA působí výhradně prozánětlivě, novější údaje naznačují, že mohou zánět také tlumit. PGE2, jeden z hlavních prozánětlivých PG, může působit i protizánětlivě, má potenciál inhibovat 5-lipoxygenázu (5-LOX) a zvyšovat 15-lipoxygenázu (15-LOX), což snižuje produkci LT4 a místo toho dává vzniknout lipoxinům. Lipoxiny (např. lipoxin A4) mohou potenciálně tlumit zánět. [27]

Eikosanoidy, především kyselina epoxyeikosatrienová (EET) a kyselina hydroxyeikosatetraenová (20-HETE), vznikají v průběhu aktivity enzymů cytochromu P450. V důsledku metabolismu ARA zprostředkovaného enzymy lipoxygenázy (LOX), včetně 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX a 15-LOX, z nichž zase adekvátně vzniká kyselina hydroperoxyeikosatetraenová (HPETE), následované HETE (viz **Obrázek 2**). 12-HETE je silným chemoatraktantem pro bazofily, eozinofily, monocyty a neutrofile a může být klíčovým modulátorem hladiny progesteronu v placentě. 15-HETE stimuluje mitózu endoteliálních buněk, zvyšuje aktivitu granulocytů a lymfocytů. Imunitní buňky pronikají do deciduy a hromadí se kolem trofoblastu, absence imunitních buněk by vedla k selhání implantace, abnormálnímu vývoji placenty a následnému ukončení těhotenství. Přestože udržování zánětlivého stavu v těhotenství umožňuje matce tolerovat plod, nadměrná aktivace může vést k patologickým těhotenským komplikacím, jako je předčasný porod nebo spontánní potrat. [28]

EPA může být za katalýzy COX metabolizována na prostaglandin a tromboxan 3. řady (např. PGE3, PGI3 a TXA3) a za katalýzy LOX může být metabolizována na kyselinu hydroxyeikosapentaenovou (HEPE) a leukotrien 5. řady (např. LTB5). [29]



Obrázek 2: Syntéza eikosanoidů [30]

N-3 EPA a DHA jsou již dlouho považovány za látky s protizánětlivými a imunomodulačními účinky. EPA a DHA jsou substráty pro biosyntézu proresolventních mediátorů, které snižují zánět a infekci. Předpokládá se, že DHA a EPA jsou prekurzory resolvinů řady D a E, u nichž se prokázalo, že působí protizánětlivě v neutrofilech, makrofázích a T-buňkách, podporují obnovu normální buněčné funkce po zánětu nebo po poranění. [31]

Alternativně mohou n-3 MK modulovat zánět prostřednictvím vlivu na produkci cytokinů. Studie buněčných kultur na myších ukazují, že EPA a DHA mohou potlačovat produkci zánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IL-8, makrofágy a monocyty a inhibovat aktivitu přirozených zabíječů. Na základě toho je zánětlivá kaskáda aktivnější při nízkých hladinách protizánětlivých n-3 MK. Nedostatek n-3 u těhotných žen může potenciálně modulovat imunitní odpověď těhotné ženy. [32]

1.2.1.8 Komplikace v těhotenství

Obezita v těhotenství je rizikovým faktorem chorioamnionitidy, předčasné předporodní ruptury membrán, porodu mrtvého plodu a novorozenecké sepse. Komorbidity obezity mohou v placentě (např. palmitoylace, hypoxie) aktivovat stresové dráhy

endoplazmatického retikula, které následně ovlivňují apoptózu a autofagii. S obezitou je spojená apoptóza v mnoha typech buněk spojených s placentou a je komplexním jevem. [33]

Syndrom polycystických ovárií (PCOS) je jednou z nejčastějších endokrinopatických komplikací u žen v reprodukčním věku. Onemocnění je multifaktoriální a je často spojeno s generalizovaným zánětem v těle, a tím i se zvýšeným rizikem neplodnosti, inzulínové rezistence, obezity a také kardiovaskulárních poruch. Bylo prokázáno, že abnormální hladiny COX-2 jsou spojeny se selháním ovulace, neplodností a poruchami implantace. V modelové studii na potkanech bylo prokázáno, že hladiny prostaglandinů a metabolitů kyseliny arachidonové byly významně vyšší v ovariální tkáni skupiny s PCOS než v kontrolní skupině zdravých jedinců. [34]

Endometrióza může mít vliv na vznik karcinomu endometria, tento nádor je jedním z nejčastějších nádorů ženských pohlavních orgánů. Bylo zjištěno, že právě nadměrná tělesná hmotnost a nadměrné působení estrogenů na endometrium jsou hlavními faktory vzniku tohoto typu nádorového onemocnění. Studie prokázaly pozitivní vliv n-3 mastných kyselin ve stravě na inhibici růstu nádorových buněk endometria *in vivo* a jejich schopnost předcházet metastázám. COX-2 je nadměrně exprimován v případě proliferace a vzniku karcinomu endometria. [35]

Infekce jsou další možnou komplikací během těhotenství, ovlivňují systém prostaglandinů a zvyšují infiltraci neutrofilů, což může vést k problémům děložního hrdla, oslabení a protržení membrán nebo kontrakcím myometria, které vedou k předčasnému porodu nebo spontánnímu potratu. [36]

Preeklampsie (PE) je často označována jako nejvíce fatální komplikace během těhotenství, její příčina zůstává stále neznámá. Tento těhotenský syndrom postihuje celosvětově přibližně 4-5 % těhotenství a je stále hlavní příčinou mateřské a perinatální morbidity a mortality. Mezi následky PE se řadí např. spontánní potrat, abrupce placenty, omezení růstu plodu, předčasné prasknutí membrán a předčasný porod. [37]

PE je považována i za poruchu placenty. Dobře známá „dvoustupňová“ teorie předpokládá, že PE je iniciována sníženou placentární perfuzí, po níž následují systematické mateřské syndromy. Tento syndrom je spojován s metabolickou dysregulací v ischemické placentě. Porucha placentární vaskularizace při PE omezuje efektivní přísun živin a kyslíku k plodu, nízká hladina kyslíku vede ke zvýšené míře apoptózy neuronů. V ranném stádiu těhotenství zajistí adekvátní invaze trofoblastů a dostatečná remodelace uterinních spirálních

arterií úspěšnou implantací a pozdější placentací. Studie však odhalily, že nedostatečný přísun energie vede k abnormální implantaci a povrchové remodelaci spirálních arterií, což následně dále narušuje placentární a fetální metabolom, určité metabolické abnormality by se mohly řadit mezi příčinné faktory pro PE, vyvolané placentární ischemií a následnými změnami metabolomu. Preeklampsie zvyšuje placentární regulaci prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 a IL-18) a snižuje protizánětlivý cytokin IL-10. Metabolismus matky však může tyto děje dále zhoršovat a placenta tyto aspekty odrážet. PE je spojena s několika metabolickými poruchami, včetně dyslipidémie, hyperurikémie, hyperglykémie a inzulínové rezistence. [38]

1.2.2 Metabolismus mastných kyselin

Mastné kyseliny jsou přijímány potravou, syntetizují se v těle anebo se vzájemně přeměňují zkracováním, prodlužováním nebo vytvářením dvojných vazeb. Placenta vyžaduje vydatný zdroj energie k pokrytí potřeb pro svůj rychlý růst, přenos živin, iontů, vitamínů, odpadních a dalších látek potřebných pro vývoj plodu z mateřské cirkulace do cirkulace plodu a naopak. MK v placentě mají vliv na průběh těhotenství, fetální metabolismus a výsledek těhotenství. Trofoblast ve značném množství oxiduje MK a využívá je jako zdroj energie. Oxidace MK v placentě je důležitým faktorem ovlivňující zdraví plodu. Defekt může bránit růstu, diferenciaci a funkci placenty a tím ohrozit růst a vývoj plodu. LCPUFA mohou být v placentě metabolizovány např. cyklooxygenázami nebo lipooxygenázami na důležité buněčné signální molekuly. [39]

1.2.2.1 Odbourávání mastných kyselin

MK musí být před oxidací aktivovány za vzniku acyl-CoA (acyl-koenzym A) enzymem acyl-CoA syntetázou. V cytosolu probíhá aktivace MK, ale oxidace probíhá v mitochondriích a je nutné překonat mitochondriální membránu. Vnější membránou prochází všechny MK přes póry a přes vnitřní membránu podle délky řetězce. MK s řetězcem do 12 atomů uhlíků procházejí volnou difúzí. LCFA se aktivují nejdříve na zevní mitochondriální membráně a následně jsou transportovány přes vnitřní membránu karnitinovým člunkem. VLCFA jsou v peroxizomech zkráceny na oktanoyl-CoA a následně transportovány do mitochondrie. V matrix mitochondriích se MK odbourávají procesem β -oxidace sledem oxidativních reakcí, kdy dochází ke zkrácení molekuly MK o dva atomy uhlíku. Výsledkem je odbourání molekuly MK na dvouuhlíkaté zbytky (acetyl-CoA), vznikající redukované koenzymy

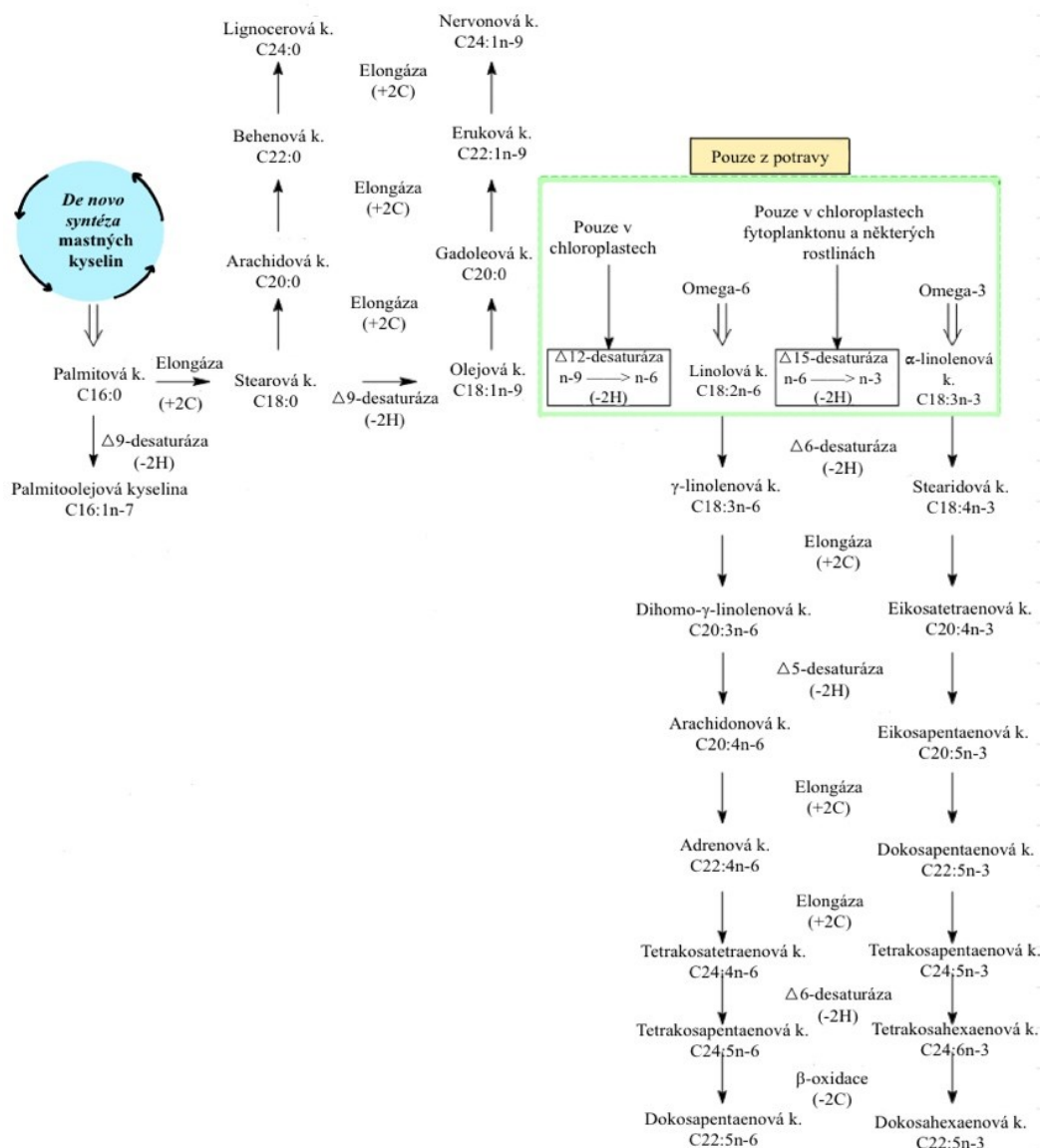
vstupují do dýchacího řetězce. β -oxidace je katalyzovaná různými koenzymy, které se specializují na různě dlouhé MK. Pro odbourání MK s dlouhým řetězcem je nutné, aby β -oxidace proběhla několikrát. [15]

UFA často obsahují *cis*-dvojnou vazbu na pozici 9 nebo 12. Odbourávání těchto MK probíhá jako u SFA, dokud β -oxidace nedojde k *cis*-dvojně vazbě na C-9. Enoyl-CoA-hydratáza metabolizuje pouze substráty s dvojnou vazbou v poloze *trans*, a proto musí dojít k izomeraci na *trans*-izomer. β -oxidace pokračuje, dokud nevznikne *trans*- Δ^2 , *cis*- Δ^4 -derivát, jenž nejde dále izomerovat a dochází k redukci proti NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfát) na *trans*- Δ^3 sloučeninu. Enoyl-CoA-izomeráza derivát přeuspořádá a β -oxidace může proběhnout až do konce. [16]

1.2.2.2 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza MK probíhá především v játrech, tukové tkáni a je katalyzovaná multifukčním enzymovým systémem - syntázou mastných kyselin. Tento děj probíhá v cytoplazmě, výchozí molekulou je acetyl-CoA. Acetylový zbytek se v cyklicky probíhajících reakcích 7x prodlouží o dva atomy uhlíku za vzniku palmitoyl-ACP, následně dojde k hydrolýze thioesterové vazby palmitoyl thioesterázou. Redukčním činidlem biosyntézy je NADPH a koncovým produktem je zpravidla nasycená kyselina palmitová (PA, C16:0). PA se po biosyntéze naváže na CoA (tato aktivace je závislá na ATP). Prodlužování palmitoyl-CoA a dalších aktivovaných MK probíhá v endoplazmatickém retikulu. Následující reakce vedou k tvorbě MK s dlouhým řetězcem. [17]

Pro zavedení dvojně vazby jsou nutné desaturázy, molekulární kyslík, NADPH a cytochrom b_5 . Prodlužování probíhá pomocí enzymů elongáz, které jsou přítomné jak v mitochondriích, tak v endoplazmatickém retikulu. Jejich mechanismus se však v obou místech liší. Elongace probíhá přidáním a redukcí acetylových jednotek, na endoplazmatickém retikulu probíhá elongace kondenzací malonyl-CoA s acetyl-CoA. Lidské tělo si dokáže syntetizovat některé UFA pomocí Δ^9 , Δ^6 , Δ^5 a Δ^4 desaturáz (viz **Obrázek 3**), postrádá však enzymy Δ^{12} a Δ^{15} desaturázy nezbytné k vložení dvojně vazby na pozici 12. a 15. uhlíku (počítáno od karboxylové skupiny) mastných kyselin. [15]



Obrázek 3: Schéma syntézy LCPUFA [40]

1.2.3 Přenos mastných kyselin

Krev plodu je v choriových klcích placenty oddělena od mateřské krve v intervalózních prostorech placentární membránou (bariérou), která je složena mj. z cytotrofoblastu a syncytiotrofoblastu. Vrstva buněk cytotrofoblastu však zeslábne a zanikne během 20. týdne těhotenství, v důsledku toho se u většiny choriových klků placentární membrána ztenčuje, což usnadňuje přístup k syncytiotrofoblastu a endotelu fetálních cév. MK mohou procházet placentárními membránami syncytiotrofoblastu jako neesterifikované mastné kyseliny (NEFA) pocházející z lipoproteinů. Placenta může mít zásadní význam v modulaci vlastního přísunu MK v závislosti na požadavcích plodu. *In vivo* a *in vitro* experimenty ukazují, že

placenta je schopna k plodu přednostně transportovat LCPUFA (pořadí preference DHA>ARA>ALA>LA). [41]

1.2.3.1 Placentární lipázy

Hydrolýza triacylglycerolů lipoproteinovou lipázou má rozhodující význam pro přísun LCPUFA k plodu. V cytosolu syncytiotrofoblastu mohou být NEFA reesterifikovány a ukládány jako triacylglyceroly pro pozdější uvolnění. Placentární mikrovilózní membrána (MVM) exprimuje lipoproteinovou lipázu (LPL), která má triacylglycerolovou (TG) hydrolázovou aktivitu. PL mohou být také hydrolyzovány, vychytávány a následně resyntetizovány v placentě. Extracelulární fosfolipáza A2 typu II (PLA2) je zodpovědná za 60-80 % fosfolipázové aktivity v placentě, ačkoli jsou zde přítomny i další intracelulární izoenzymy PLA2 s různými funkcemi a regulacemi. V placentární tkáni byla také prokázána exprese receptorů pro lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDLR) a také receptor pro lipoproteiny o nízké hustotě (LDLR). Studie také prokazují expresi mRNA (messengerová ribonukleová kyselina) pro endoteliální lipázu (EL), která hydrolyzuje především PL v HDL (lipoprotein o vysoké hustotě), ačkoli má také určitou aktivitu TG lipázy. [41]

LA a ARA se předávají vyvíjejícímu plodu v různých lipidových frakcích, což naznačuje, že kompartmentace MK placentou by mohla přispět k selektivnímu přenosu některých MK. Ve studiích bylo také zjištěno, že neesterifikovaná LA a PA procházejí placentou podobnou rychlostí a LA vykazuje relativní preferenci pro přenos z mateřského do fetálního oběhu ve srovnání s ARA. [42]

1.2.3.2 Transportní proteiny

Přenos mastných kyselin přes placentu zahrnuje jejich vazbu na několik proteinů (viz **Obrázek 4**). Existují různé proteiny, které vychytávají a dále transportují MK, jsou jimi translokáza mastných kyselin (FAT/CD36), transportní protein mastných kyselin (FATP), na přenosu se podílí také placentární proteiny vázající mastné kyseliny plazmatické membrány (p-FABPpm) a proteiny vázající mastné kyseliny (FABP). [43]

1.2.3.3 FATP

FATP je rodina integrálních transmembránových proteinů skládající se ze šesti (FATP 1–6) izoform, které se liší mírou tkáňové exprese a účastní se transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem. FATP byly klasifikovány jako transportní proteiny mastných kyselin,

protože při nadměrné expresi zvyšují rychlost internalizace mastných kyselin, zejména při nízkých koncentracích, kdy difúze nemusí být dostatečná. FATP-1 je důležitý při internalizaci mastných kyselin, proto je ve velkém množství lokalizován na plazmatické membráně. [44]

1.2.3.4 FAT/CD36

FAT/CD36 je glykosylovaná translokáza mastných kyselin (FAT/CD36), jehož sekvence je z 85 % homologická s glykoproteinem IV (CD36), jedná se o integrální protein. Na rozdíl od FABPpm, FATP je FAT/CD36 multifunkční protein s několika ligandy, včetně volných mastných kyselin, kolagenu a oxidovaného LDL. FAT/CD36 byl prokázán v lidské placentě za použití jak čistých trofoblastových buněk, tak preparátů placentární membrány. FAT je přítomen v mikrovilózní a bazální membráně syncytiotrofoblastu a je důležitý pro transport MK s dlouhým řetězcem. [39]

1.2.3.5 pFABPpm

Expresí genu pro pFABPpm v plazmatické membráně byla detekována v tkáni klků a nachází se pouze na mikrovilózní membráně (čelem k mateřské krvi). Uvnitř buňky jsou MK navázány a transportovány pomocí FABP. Odtud mohou MK vstupovat do různých metabolických cest, včetně β -oxidace, přeměny na eikosanoidy a reesterifikaci za vzniku fosfolipidů a triacylglycerolů, ty pak mohou být uloženy v lipidových kapénkách v syncytiotrofoblastu. V placentárních buňkách syncytiotrofoblastu byly popsány FABP1, 3, 4, 5 a 7. FABP1 (jaterní FABP) a FABP3 (srdeční FABP) má větší afinitu k DHA než ARA. FABP4 (adipocytový FABP) váže DHA pevněji než ARA. [44]

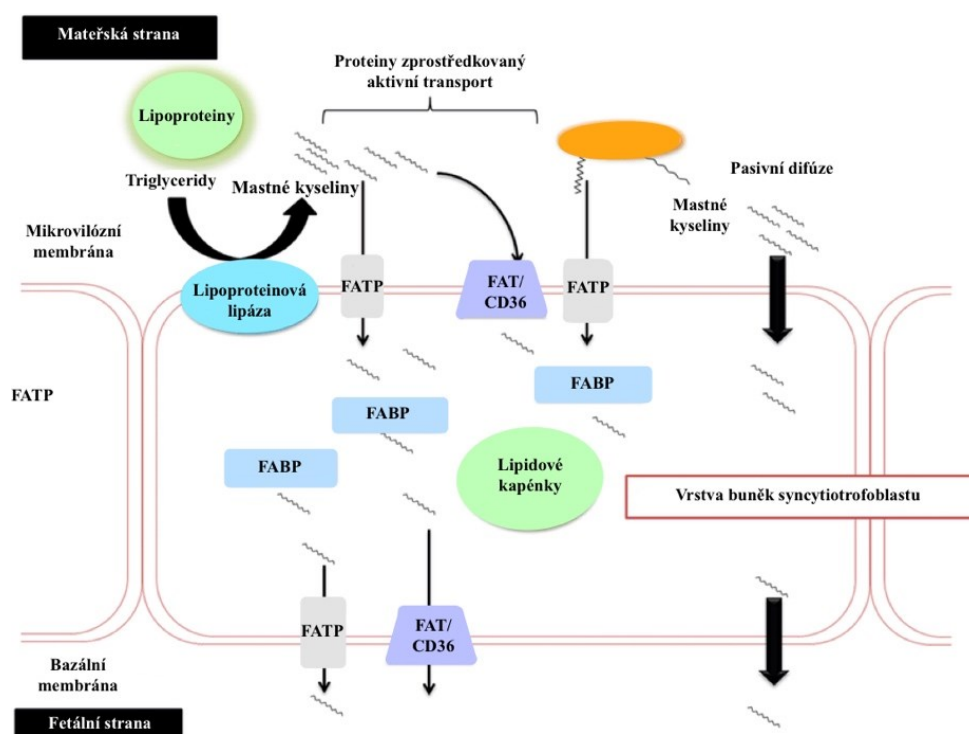
1.2.3.6 MFSD2a

MFSD2a (membránový transportér super rodiny domény 2a) je spojený se selektivním transportem DHA ve formě lysofosfolipidů. Expresí MFSD2a korelovala se sníženou DHA u žen s GDM, což indikuje jeho spojení s transportem DHA. [45]

1.2.3.7 PPAR

Na přenos mastných kyselin placentou se podílejí receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR), které patří do skupiny steroidních receptorů a jedná se o mastnými kyselinami aktivované jaderné transkripční faktory. PPAR jsou kritickými regulátory vývoje a fyziologické funkce fetoplacentární jednotky. Známé jsou tři podtypy PPAR: PPAR- α ,

PPAR- γ a PPAR- δ . PPAR- δ a PPAR- γ jsou důležité při diferenciaci a zrání trofoblastu, PPAR- α souvisí s regulací katabolismu lipidů. PPAR jsou ligandem aktivované jaderné receptory. Vazbou specifického ligandu dochází k heterodimerizaci PPAR s retinoidním receptorem X (RXR). K heterodimeru se mohou navázat korepresory nebo koaktivátory. Komplex PPAR/RXR s kofaktorem ovlivňují transkripční aktivitu cílových genů. Tento komplex se poté pomocí DNA (kyselina deoxyribonukleová) vazebné domény váže k responsibilnímu elementu (PPRE). PPRE představuje vazebné místo na DNA, lokalizované v promotorech cílových genů, které jsou zapojeny v metabolismu lipidů a energetické homeostázy, včetně skladování lipidů, katabolismu a transportu mastných kyselin. [41]



Obrázek 4: Schéma transportu MK buňkami syncytiotrofoblastu [46]

1.3 Chromatografie

Chromatografie je jedna z nejdůležitějších analytických metod, která umožňuje separaci směsi látek na jednotlivé komponenty mezi dvě vzájemně nemísitelné části. Stacionární fáze působí na migrující molekuly více či méně selektivní silou, která působí proti hnací síle mobilní fáze a má tendenci zpomalovat migraci jednotlivých složek směsi. Tuto odporovou sílu může být někdy obtížné definovat, a proto je vhodné ji označit termínem sorpce

a stacionární fázi označit jako sorbent. Během chromatografie migrující molekuly opakovaně procházejí jak sorpcí, která je selektivně zpomaluje, tak i desorpcí, která jim umožňuje nechat se unášet spolu s mobilní fází. Tento kontinuální distribuční proces definuje základ chromatografických separací, rozlišuje se mnoho chromatografických metod (viz **Tabulka 1**). [47]

Chromatografické metody jsou založené na velmi účinné separaci a identifikaci malých molekul a mají mnoho využití, např. separace a analýza přídatných látek, vitamínů, proteinů, aminokyselin, mastných kyselin v jídle nebo tělních tkáních, testování drog v klinické toxikologii, forenzní analýze důkazů, jako jsou vzorky krve, vlasů a tkanin nebo studie proteinů, peptidů a nukleových kyselin. [48]

Tabulka 1: Rozdělení chromatografických metod [49]

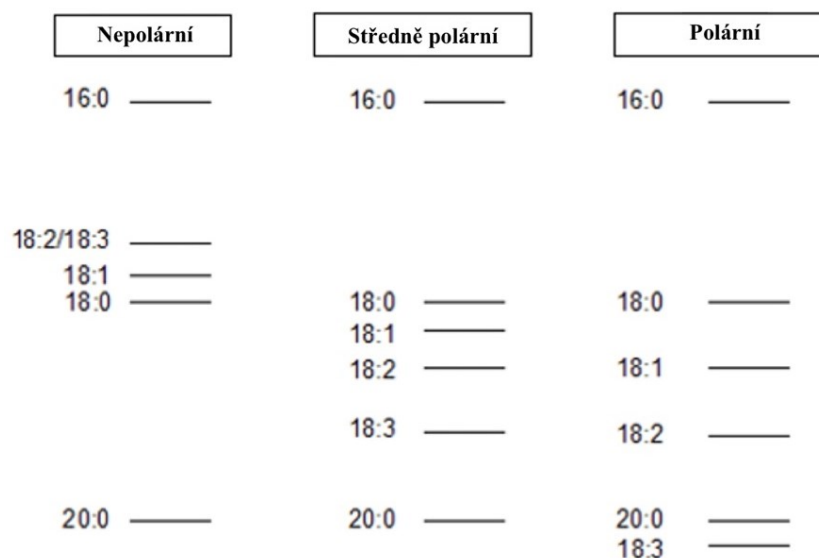
Typ chromatografie	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Nosič stacionární fáze	Technika	Zkratka
Adsorpční chromatografie	Plyn	Pevná	Kolona	Plynová chromatografie	GS/GSC
	Kapalina	Pevná	Kolona	Kapalinová chromatografie	LC
				Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	HPLC
		Pevná	Planární vrstva	Tenkovrstvá chromatografie	TLC
Rozdělovací chromatografie	Plyn	Kapalina	Kolona	Plynová chromatografie	GS/GLC
	Kapalina	Kapalina	Kolona	Kapalinová chromatografie	LC
				Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	HPLC
		Kapalina	Planární vrstva	Papírová chromatografie	PC
Iontově-výměnná chromatografie	Kapalina	Iontoměnič	Kolona	Iontově-výměnná chromatografie	IEX
Permeační chromatografie	Kapalina	Polymerní matrix	Kolona	Gelová chromatografie	SEC/GPC

1.3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je metoda založená na separaci par a plynů za zvýšené teploty (teplotní gradient). Těkavé látky se separují na základě rozdílů teplot varu (nepolární stacionární fáze) a afinit k polární stacionární fázi. GC využívá jako mobilní fázi plyn, stacionární fáze je buď tuhá (GSC) nebo kapalina zakotvená či chemicky vázaná na nosiči (GLC). Plynový chromatograf se skládá z kolony, která je umístěná v termostatu. Průtok plynu je regulován digitálně nebo analogově. Před kolonou je dávkovač, který umožňuje vzorkům těkavých kapalin jejich zplynění a vzorkům plynu nechat se unášet nosným plynem na kolonu. Dávkuje se pomocí injekční mikrostříkačky skrz gumové nebo silikonové septum, u automatizovaných přístrojů pomocí autosampleru. Obvykle se pomocí GC separují směsi kapalin, kdy musí být dávkovač přehřátý na vyšší teplotu (50 °C nad bodem varu nejméně těkavé látky ve vzorku), aby došlo k okamžitému odpaření. U split dávkování je část vzorku vedena na kolonu a zbytek se odpaří. Většina split dávkovačů má i mód splitless, kdy je celý nastříknutý objem vzorku nesen na kolonu. Další možnost je přímé (on-column) dávkování, kdy vstup injekční mikrostříkačky je přímo na koloně. Na kolonu navazuje detektor, který detekuje látky v nosném plynu a počítač, kde se vyhodnocují data. [50]

Přenos látek kolonou zajišťuje nosný plyn (inertní plyn), který se neúčastní interakcí, využívá se např. helium, dusík, argon nebo vodík. Helium je vhodný pro kapilární kolony, má zároveň největší účinnost (počet pater i rozlišení), nevýhodou je jeho nedostatek a vyšší cena, dusík je naopak nejméně používaný u kapilárních kolon a má omezený rozsah rychlostí, vodík je využíván u vysokorychlostních GC, nevýhodou je jeho možná nebezpečnost. U nosného plynu je důležité dbát na viskozitu (roste s teplotou) a hustotu, jelikož ovlivňují průtok plynu kolonou. Stacionární fáze by měla být ideálně málo těkavá, teplotně stabilní a chemicky nereaktivní. Retenční čas analytu na koloně závisí na jeho distribuční konstantě, která je spojena s chemickou podstatou kapalně stacionární fáze. Analyt musí mít určitou kompatibilitu (rozpuštěnost) se stacionární fází. Princip „podobné se rozpouští v podobném“ by se dal přirovnat k polaritám analytu a imobilizované kapaliny, pokud je shoda dobrá, pořadí eluce je určeno bodem varu eluentů. Stacionární fáze používané na analýzu MK jsou např. polyethylen glycol (Carbowax 20M), 5 % phenyl-polydimethyl siloxan (OV-3) a 50 % cyanopropyl-polydimethyl siloxan (OV-275). Methylsilikony patří mezi nejpoužívanější nepolární stacionární fáze, a byly jako první vyvinuty pro kapilární fázi GC. Většinu FAME (methylestery mastných kyselin) lze separovat pomocí methylsilikonových kolon, zejména

těch velmi málo polárních, jako je purifikovaný methylsilikon. Na nepolárních kolonách se FAME eluují podle bodu varu, UFA se eluují před odpovídajícími SFA se stejnou délkou řetězce. U středně a vysoce polárních stacionárních fází dochází k eluci v opačném pořadí (viz **Obrázek 5**). [51]



Obrázek 5: Pořadí eluce FAME na GC kolonách s různou polaritou [52]

1.3.1.1 Kolony na analýzu plynovou chromatografií

V plynové chromatografii se používají dva typy kolon – náplňové a otevřené kapilární. V minulosti se nejvíce používaly náplňové, které se postupně nahradily účinnějšími kapilárními kolonami. Délka náplňových kolon se pohybuje okolo 1-5 m, kdežto kapilární dosahují délky až 200 m. Moderní náplňové kolony jsou vyrobené ze skla nebo kovu, můžou být mikronáplňové nebo náplňové kapilární. Náplňové GC kolony jsou stále používané pro předběžnou analýzu nebo screeningové postupy, ale detekce vyžaduje mnohem vyšší rozlišovací schopnost. U otevřených (kapilárních) kolon je stacionární fáze zakotvená na nosiči nebo chemicky vázaná, jsou 3 typy: WCOT (kolona pokrytá tenkou vrstvou stacionární fáze), SCOT (vnitřní povrch je kryt tenkým filmem) a PLOT (kolona kryta vrstvou adsorbentu). Nejvíce se používají kapilární kolony z taveného křemíku – obsahují minimum oxidů kovů a mají mnohem tenčí stěny než skleněné kolony. Kolony jsou ještě zpevněné vnější vrstvou ochranného polyimidu, což jim poskytuje také ohebnost. [51]

Vynikající rozlišovací schopnosti kapilárních kolon umožňují rutinní identifikaci MK na základě retenčního času, zejména pokud se analýza provádí se stacionárními fázemi různých

polarit. Kapilární kolony vyžadují pečlivější laboratorní postupy, vyšší odezvu detektoru (pro ostré a rychle eluující píky) a citlivější detektor pro malé velikosti vzorků. Vhodným způsobem, jak charakterizovat GC kolony, je index polarit. [53]

1.3.1.2 Detektory v plynové chromatografii

Detektory v GC jsou navrženy tak, aby generovaly elektronický signál po průchodu eluovaného plynu z kolony. Detektory se odlišují ve své konstrukci, selektivitě a schopnosti měřit malé koncentrace. Selektivita se vztahuje k typu látky, pro kterou lze signál generovat, např. plamenově ionizační detektor (FID) změří velmi malé koncentrace, ale nedetekuje vše, takže je selektivní jen pro určitou skupinu látek, na druhou stranu tepelně vodivostní detektor (TCD) detekuje vše (univerzální detektor), ale nezměří malé koncentrace. Ideálně by měl mít detektor dobrou stabilitu, reprodukovatelnost, lineární odpověď a rozsah teplot od pokojové až po 400 °C. [54]

Plamenově ionizační detektor (FID) je nejpoužívanější detektor v GC. Eluát z kolony přímo vstupuje do plamene (vzduch-vodík), kde dojde ke spálení. Během procesu spálení je malá frakce molekul fragmentována a vznikají pozitivně nabití ionty, které jsou přitahovány ke kolektoru (negativně nabitá elektroda), následně je proudem iontů generován proud, které lze měřit. FID detekuje pouze organické látky, které hoří a fragmentují se v plameni, detektor je velmi senzitivní a má lineární odpověď. Nevýhodou je, že ničí (spálí) vzorek a vyžaduje přídatné plyny a regulátory. [55]

Tepelně vodivostní detektor (TCD) byl jeden z prvních detektorů a stále je široce používaným. TCD obsahuje elektricky vyhřívané vlákno, které může být z jemné platiny, zlata nebo wolframového drátu, alternativou může být také malý termistor. TCD využívá rozdíl v tepelné vodivosti nosného plynu a vodivosti složky ve vzorku. Změny tepelné vodivosti jsou vnímány jako změna elektrického odporu, který se v jednoduchém obvodu převede na elektrické napětí. Tepelná vodivost je nepřímo úměrná velikosti molekul, jako nosný plyn se používá helium, který má oproti ostatním velkou tepelnou vodivost. TCD je univerzální a nedestruktivní. [50]

Termoionizační detektor (TID), označovaný také jako dusíko-fosforový (NPD), je selektivní pro sloučeniny obsahující dusík a fosfor. TID je konstrukčně alternativou k FID, nad plamenem se nachází vyhřívané tělísko ze soli alkalických kovů, kolem něj prochází

nosný plyn smíchaný s vodíkem. Průtok vzduchu a vodíku je nižší než u FID, což minimalizuje fragmentaci ostatních organických částic. [55]

Plamenově fotometrický detektor (FPD) je specifický pro organické látky obsahující síru a fosfor. Eluent prochází vodíkovým plamenem o nízké teplotě a z fosforu vzniká HPO, ze síry ve vzorku S₂, vznikající emise z plamene se měří fotonásobičem. Výhodou je jeho selektivita a možnost detekovat malé koncentrace, nevýhodou je nutnost opatrně kontrolovat podmínky plamene. Pomocí FPD se měří také látky obsahující halogeny, dusík, selen nebo germanium. [56]

Detektor elektronového záchytu (ECD) se stal jedním z nejpoužívanějších detektorů pro vzorky z životního prostředí kvůli své selektivní odpovědi na přítomnost halogenů v organických látkách (pesticidy, polychlorované bifenyly). Eluovaný vzorek z kolony projde radioaktivním zářičem β (⁶³Ni, ³H), elektrony ze zářiče způsobují ionizaci nosného plynu (často N₂) a výboje elektronů. Vzniká proud mezi elektrodami, měřená látka zachytí elektron a proud klesne úměrně koncentraci a dojde k poklesu signálu. Látky bez afinity k elektronům jen projdou. ECD je selektivní pro negativně nabitě látky, málo nebo vůbec citlivý je k funkčním skupinám (např. aminy nebo alkoholy). [55]

Spojení GC a hmotnostní spektrometrie (MS) je dnes běžně používané. Dochází k převedení molekul na ionty s jejich následným rozlišením podle poměru hmotnosti a náboje. Pro převedení neutrálních molekul analytu na ionty se využívá mnoho ionizačních technik, např. tvrdé, měkké ionizační techniky nebo ionizace za sníženého tlaku. Pro plynovou chromatografii je nejčastěji používaná elektronová „tvrdá“ ionizační technika (EI), při které vzniká následkem nadbytku vnitřní energie více fragmentů molekulového iontu. Při použití EI je možnost přímého softwarového porovnání s knihovnou spekter. Rozdělení iontů probíhá v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje. Mezi používané hmotnostní analyzátoři pro GC/MS patří kvadrupólový analyzátor, iontová past, analyzátor doby letu nebo magnetický sektorový analyzátor. GC/MS se používá výhradně ve spojení s kapilárními kolonami. [57]

1.3.2 Analýza mastných kyselin

Většina MK je v přírodních vzorcích přítomna jako vázané mastné kyseliny, které mohou být přeměněny na VMK hydrolýzou. MK se pro analýzu GC derivatizují na FAME. Analýza FAME se skládá z několika kroků, které zahrnují extrakci mastných kyselin, esterifikaci,

nástřík na kolonu, separaci, identifikaci a kvantifikaci FAME. K dosažení vysoké přesnosti a preciznosti analýzy musí být jednotlivé kroky optimalizovány. Pro kvantitativní analýzu lze využít několika postupů – odezvového faktoru, interního standardu (IS) nebo standardního přídatku. Esterifikační činidla (označovaná jako činidla, která převádějí VMK na estery) a transesterifikační činidla (ta, která převádějí acylglyceroly na estery mastných kyselin) se obecně dělí do dvou kategorií: "kyselinou katalyzovaná" a "zásadou katalyzovaná" činidla. [53]

1.3.2.1 Příprava vzorků

Široké spektrum různých látek, ve kterých se MK vyskytují, vyžadují různé a vhodné skladování. Tekutý materiál (sérum nebo plazma) se okamžitě zmrazují při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatímco pevné tkáně se zamrazují v tekutém dusíku. K zabránění enzymatické aktivity se dosahuje přidáním kyseliny trichloroctové nebo methanolu ke vzorku. [58]

1.3.2.2 Extrakce

Analýza mastných kyselin zahrnuje jejich extrakci a rozdělení na příslušné lipidové složky pomocí rozpouštědel, tenkovrstvé chromatografie (TLC), extrakce na pevné fázi (SPE), extrakce nadkritickou kapalinou (SCE) nebo extrakce s použitím mikrovln. Klasické metody používají směs chloroformu a methanolu. MeOH je mísitelný s vodou a neslouží primárně jako rozpouštědlo pro extrakci lipidů, ve skutečnosti narušuje elektrostatické síly a vodíkové vazby mezi proteiny a lipidy. CHCl_3 převážně zprostředkovává difúzi a přenos lipidů z buněk. MeOH lze nahradit ethanolem nebo isopropanolem (2-propanolem). Ethanol má podobnou polaritu pro rozrušení membrán lipidů-proteinů jako methanol. Isopropanol může být slabší v narušování těchto interakcí kvůli větší hydrofobní části. Extrakce dle Folche, Blighe a Dyera využívá různý poměr nepolárních a polárních rozpouštědel, hlavní rozdíly mezi těmito protokoly (Folcha *et al.*, Bligha a Dyera) spočívají v poměru chloroform/methanol/voda (2:1:0,75 u Folche a 1:1:0,9 % u Bligha a Dyera) a v přítomnosti (metoda Folche) nebo nepřítomnosti (metoda Bligha a Dyera) solí v přidané frakci vody. Metody Bligha, Dyera a Folche používají toxický chloroform/methanol, proto byla snaha o nahrazení relativně bezpečnějšími nebo ekologickými rozpouštědly. [59]

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) je starší a rozšířenější metoda, která je běžně používanou technikou izolace příslušných tříd lipidů. Umožňuje separaci komplexní směsi

na chromatografické desce na bázi silikagelu. TLC nevyžaduje žádné drahé a sofistikované vybavení ani mnoho rozpouštědel. V průběhu však nelze zabránit oxidaci UFA při dlouhém působení vzdušného kyslíku, což je její hlavní nevýhodou. Vhodně zvolený systém rozpouštědel umožňuje rozdělení lipidů do těchto tříd: cholesterol (CH) a estery cholesterolu (ECH), triacylglyceroly (TG), diacylglyceroly (DG), volné mastné kyseliny (VMK) a fosfolipidy (PL). [60]

1.3.3 Derivatizace mastných kyselin

Volné MK se v přírodních vzorcích značně odlišují, např. v délce řetězce nebo funkčních skupinách. Při analýze pomocí GC je důležité, aby látky nebo směsi látek byly těkavé. Přímá analýza volných MK pomocí GC je obtížná kvůli jejich vysoké polaritě, nízké těkavosti a tendenci vytvářet vodíkové vazby, což vede k problémům s adsorpcí. Derivatizace mastných kyselin pro GC analýzu se provádí za účelem zvýšení těkavosti látek, zlepšení separace a snížení chvostování. Vývoj technologie kolon s vázanými fázemi nabízí efektivní separaci a menší vymývání stacionárních fází. Pokud je však požadována vyšší citlivost, pak je nutná ke zvýšení citlivosti derivatizace. Methylderiváty MK jsou nejpoužívanější díky široké škále dostupných methylačních a transesterifikačních postupů a vhodnému vybavení. Dříve se používalo zmýdelnění hydroxidem sodným nebo hydroxidem draselným, což vyžaduje velmi dlouhou reakční dobu. Přímá transesterifikace lipidů ("alkoholýza") probíhá mnohem rychleji, kdy hydrolyza a esterifikace probíhá v jednom kroku a je zapotřebí pouze jedno činidlo. Pro přesné výsledky je však nutné transesterifikaci optimalizovat. Problémy spojené s přípravou esterů zahrnují např. nekompletní konverzi lipidů na FAME, ztráty vysoce těkavých FAME s krátkým řetězcem nebo změna v původní kompozici MK během transesterifikace. I běžně používané metody nemusí poskytovat přesné výsledky, a proto by se před měřením měla ověřit přesnost použití lipidových standardů. Vzhledem k velkému počtu vzorků, které je třeba analyzovat, se objevila obecná tendence hledat rychlé metody esterifikace a analýzy. [61]

1.3.3.1 Kyselá derivatizace

Mezi používaná kyselá činidla řadíme kyselina chlorovodíková, sírová nebo fluorid boritý v methanolu. Reakce však neprobíhají při pokojové teplotě a vyžadují zahřívání. Komplex BF₃-MeOH (12-14 % w/v) je vhodný pro všechny typy lipidů. Při zahřívání na 100 °C je transesterifikace dokončena pro VMK do 2 minut, do 10 min pro fosfoglyceridy, do 30 min

pro triacylglyceroly a do 90 min pro sfingomyeliny. Navzdory své široké oblibě má komplex BF₃-MeOH několik nevýhod. Pokud není činidlo chlazeno, má pouze omezenou trvanlivost. Použití starých nebo příliš koncentrovaných roztoků může vést ke vzniku artefaktů nebo ztrátě PUFA. [53]

VMK se methylují v bezvodém MeOH za přítomnosti elektrofilního katalyzátoru kyseliny chlorovodíkové (HCl). Lze použít i jiné elektrofilní katalyzátory, např. koncentrovanou kyselinu sírovou nebo kyselinu dichloroctovou. Alternativně lze použít kapalný acetylchlorid k bezvodému MeOH, pokud by methylacetát nenarušoval analýzu. [58]

1.3.3.2 Bazická derivatizace

Methoxid sodný v methanolu je obecně vhodný pro přeměnu acylglycerolů na methylestery. Tato metoda je rychlá a lze ji provádět při pokojové teplotě. Za takto mírných podmínek činidlo nezpůsobuje žádnou izomerizaci dvojných vazeb. Nevýhodou tohoto činidla je, že nepřevádí VMK na FAME, tudíž pokud je ve vzorku přítomno velké množství VMK, není technika příliš užitečná. Podmínkou je bezvodé prostředí, protože přítomnost vody způsobuje zmýdelnění, čímž dochází ke ztrátě mastných kyselin. Dlouhodobé používání tohoto činidla může způsobit alterace ve složení mastných kyselin. Použití vysokých koncentrací báze a vysokých teplot by mohlo vést ke vzniku konjugovaných mastných kyselin. Dalším transesterifikačním činidlem je hydroxid draselný v methanolu, který se běžně používá při transesterifikaci olejů, zejména rafinovaných. [53]

1.3.3.3 Diazomethan

Diazomethan je rychlé esterifikační činidlo, které esterifikuje VMK na FAME v přítomnosti MeOH. Reakce probíhá krátkou dobu při teplotě 0 °C nebo při pokojové teplotě. Diazomethan v éterickém roztoku působí rychleji než kyselé katalyzátory a nevyvolává transesterifikaci. Diazomethan je však toxický, karcinogenní, žíravý a výbušný, což odrazuje od jeho širšího použití. Při methylaci karboxylových kyselin diazomethanem mohou být ovlivněny další funkční skupiny (fenolové, enolové, karbonylové nebo olefinové vazby). Za vhodných podmínek methylace diazomethanem poskytuje dobré výsledky. [58]

2 Experimentální část

2.1 Seznam chemikálií

- a) Deproteinační roztok
- Isopropylalkohol, p.a.
 - Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
 - n-heptan, čistý
 - Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
 - Kyselina trihydrogenfosforečná, p.a.
 - Výrobce: PENTA s. r. o., Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR
- b) Mobilní fáze na TLC
- Diethylether, p. a., nestabilizovaný
 - Výrobce: PENTA s. r. o., Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR
 - Kyselina octová, čistá
 - Výrobce: PENTA s. r. o., Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR
 - n-hexan, p. a.
 - Výrobce: PENTA s. r. o. Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR
- c) Detekční činidla
- 2', 7' -dichlorfluorescein
 - Výrobce: Carl Roth GmbH + Co.KG, 76185 Karlsruhe, Německo
 - Roztok kyseliny fosfomolybdenové
 - Výrobce: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, 820 24, Taufkirchen, Německo
- d) Vnitřní standard
- Kyselina *cis*-13, 16, 19 dokosatrienová
 - Výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko
- e) Ostatní chemikálie
- Methanol, p.a.
 - Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
 - Chloroform, p.a.
 - Výrobce: PENTA s. r. o. Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR

- Toluén, p.a.
 - Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Acetylchlorid
 - Výrobce: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo
- Uhličitan draselný, bezvodý
 - Výrobce: PENTA s. r. o. Ing. Petr Švec, Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10, ČR
- Standard pro TLC: pool plazma

2.2 Seznam přístrojů a pomůcek

- Automatické pipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Analytické váhy Adventurer™ Pro
- Skleněné pipety – 5 a 10 ml
- Odměrné válce – 100 a 250 ml
- Magnetická míchadla
- Pasteurovy pipety
- Chromatografická vana
- Chromatografické vialky s pryžovým septem
- Pyrexové zkumavky
- Inserty do chromatografických vialek
- Centrifuga typ MPW-340
- Třepačka Vortex typ: REAX top
- Termoblok a odpařovací zařízení: Pierce Reacti. Thermo Scientific, Asheville, NC, USA)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A GC Systém, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Kolona HP-88 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Tlakové láhve
 - Dusík: N₂ 4.0, UN 1066, výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
 - Helium: He 5.0, UN 1046, výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR

- Vodík: H₂ 5.0 ≥ 99, 999, výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
- Vzduch: O₂ 20 %, N₂ 80 %, UN 1956, výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
- UV 240 lampa (A. Krüss Optronik GmbH, Darmstadt, Německo)
- Chromatografické desky – TLC Silica gel 60, 25 Glass plates 20x20 cm

2.3 Postup práce

2.3.1 Příprava vzorků

Zpracováno bylo celkem 30 vzorků placent - 15 fyziologických a 15 patologických. Po rozmražení byly vzorky naváženy (viz Tabulka 2) a následně zhomogenizovány. Postup zpracování je popsán v následujících kapitolách.

Tabulka 2: Navážky vzorků placent

Fyziologické vzorky		Patologické vzorky	
	[g]		[g]
1	17,21	16	28,54
2	15,93	17	30,51
3	18,04	18	27,68
4	14,97	19	29,64
5	15,65	20	28,57
6	16,97	21	27,64
7	17,06	22	26,48
8	18,52	23	27,61
9	18,45	24	28,48
10	15,64	25	30,12
11	16,34	26	29,87
12	17,27	27	27,15
13	16,84	28	26,68
14	16,72	29	30,75
15	15,86	30	30,51

2.3.2 Příprava standardu pro kalibrační křivku

Kalibrační křivka byla připravena zředěním zásobního standardního roztoku vybraných mastných kyselin. K 1 ml zásobního roztoku mastných kyselin byly přidány 4 ml methanolu.

Směs byla promíchána na vortexu a do připravených zkumavek bylo napipetováno 0, 50, 100, 200 a 400 μl . Obsah zkumavek byl následně odpařen do sucha v atmosféře dusíku. Přidáno bylo 500 μl poolové plazmy a 2,5 ml deproteinačního roztoku. Deproteinační roztok obsahoval 2-propanol, n-heptan a 2M H_3PO_4 v poměru 40:20:1.

Směs byla ponechána 10 minut při laboratorní teplotě a následně byl přidán 1 ml vnitřní standardu o koncentraci 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (kyselina *cis*-13, 16, 19 dokosatrienová) a 1,5 ml destilované vody. Směs byla centrifugována 10 minut při 3000 otáček. Horní organická vrstva byla přenesena do předem připravených zkumavek a odpařena do sucha v atmosféře dusíku. Frakce lipidů ve vzorcích byly separovány pomocí TLC (viz kapitola 2.3.4). Následně byla použita pouze frakce VMK, která byla zpracována postupem uvedeným v kapitole 2.3.5. a 2.3.6.

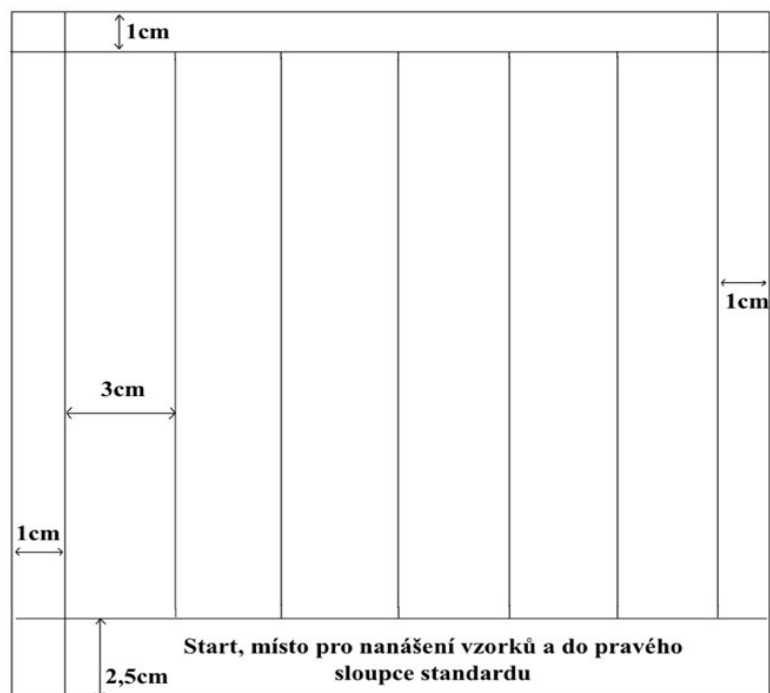
2.3.3 Denaturace bílkovin a extrakce lipidů

Do pyrexových zkumavek bylo napipetováno 500 μl vzorku zhomogenizované tkáně. Následně bylo přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku (viz kapitola 2.3.2). Směs byla promíchána na vortexu a ponechána stát 10 minut při laboratorní teplotě. Do zkumavek byl dále přidán 1 ml methanol/toluenu v poměru 1:4 a 1,5 ml destilované vody a výsledná směs byla opět zvortexována a dále centrifugována 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. Horní organická vrstva byla přepipetována do nových, čistých zkumavek a obsah byl odpařen do sucha v atmosféře dusíku při pokojové teplotě.

2.3.4 Tenkovrstvá chromatografie

Pro přípravu mobilní fáze TLC bylo smícháno 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml 98 % kyseliny octové. Směs byla přelita do chromatografické vany a po dobu 30-40 minut probíhalo sycení před vložením chromatografické desky.

Na chromatografické desce byl vyznačen start, čelo a jednotlivé dráhy. Startovní linie byla naznačena 2,5 cm od okraje desky, boční strany 1 cm od okraje a vnitřní část desky rozdělena do 6 drah po 3 cm (viz **Obrázek 6**).



Obrázek 6: Příprava chromatografické desky pro TLC

K odparku bylo přidáno 75 μl směsi chloroform/methanol v poměru 2:1 a následně zvortexovaný obsah byl postupně nanesen na TLC desku Pasteurovými pipetami. Nanášení bylo provedeno rovným tahem na naznačené startovní linie, zároveň nesmělo dojít k poškození desky a nesměl se pipetovaný objem dotýkat ohraničení, proto se nanášelo 0,5 cm od okraje jednotlivých drah. Zasnutá deska byla vložena do chromatografické vany a nechala se vyvíjet, nejdříve na úroveň startovní linie, kdy byla deska vyndána a došlo k zafixování fosfolipidů, následně byla deska umístěna zpět a po dobu 45 minut až 1 h došlo k vyvíjení až do čela desky. Po uplynutí dané doby je deska rozdělena na jednotlivé frakce: fosfolipidy (PL), diacylglyceroly (DG), volné mastné kyseliny (VMK), triacylglyceroly (TG) a estery cholesterolu (ECH). Na desce byl viditelný pouze cholesterol, který se nevyškrabává.

Pro detekci a správné označení frakcí byl použit 2,7 - dichlorfluorescein, který je nastříkán rovnoměrně na desku v oblasti standardu, poté je použita UV lampa pro vizualizaci. Pro detekci byl použit také roztok kyseliny fosfomolybdenové, u kterého nebylo nutné použít UV lampu.

Podle standardu byly měkkou tužkou a pravítkem označeny jednotlivé složky lipidů tak, že nad horním i pod dolním okrajem skvrny zbývá asi 0,5 cm. Označená pole byla vyškrabána do pyrexových zkumavek s uzávěrem s teflonovým těsněním.

2.3.5 Derivatizace – převedení na methylestery

Do pyrexových zkumavek s frakcemi bylo přidáno teflonové míchadlo, 1 ml roztoku interního standardu pro plynovou chromatografii o koncentraci 10 µg/ml a 1 ml směsi methanol/toluen v poměru 1:4.

Termobloky byly vyhřány na cca 100 °C a míchadlo nastaveno na 8. Do připravených pyrexových zkumavek bylo napipetováno 200 µl acetylchloridu, který je katalyzátorem reakce. Zkumavky byly uzavřeny a po dobu 1 h probíhala esterifikační reakce.

Po uplynutí této doby byly zkumavky ochlazeny na pokojovou teplotu stáním v digestoři, následně přidáním 5 ml 6 % K₂CO₃ došlo k neutralizaci. Po přidavku byly zkumavky uzavřeny a intenzivně třepány v ruce 2 minuty a umístěny do centrifugy po dobu 10 minut na 3000 otáček za minutu. Horní organická fáze byla odpipetována do čistých zkumavek a obsah odpařen pod dusíkem do sucha. K odparku bylo přidáno 100 µl methanol/toluen v poměru 1:4, obsah byl zvortexován a přepipetován do připravených vialek s insertem. Zkumavky byly uzavřeny víčkem s pryžovým septem a umístěny do mrazáku.

2.3.6 Plynová chromatografie

Připravené vzorky v uzavřených vialkách byly naskládány do karuselu (max. 15 vzorků). Po naprogramování dané sekvence pro sadu vzorků byl spuštěn plynový chromatograf Agilent Chromatography 7890A. Teplotní program na koloně byl následující: počáteční teplota byla 130 °C po dobu 1 minuty, následuje teplotní gradient:

- o 2 °C za minutu do teploty 176 °C po dobu 2 minut
- o 1 °C za minutu do teploty 186 °C po dobu 1 minuty
- o 0,2 °C za minutu do teploty 190 °C po dobu 1 minuty
- o 1 °C za minutu do teploty 220 °C po dobu 4 minut

Celkový čas analýzy byl 92 minut, po 5 vzorcích bylo vždy nutné promytí hexanem. Měření probíhalo v módu split v poměru 10:1.

Pro identifikaci jednotlivých píků mastných kyselin byly použity eluční časy získané z kalibrace měřením jednotlivých mastných kyselin. Veškeré analýzy byly s použitím vnitřního standardu. Získané chromatogramy byly integrovány v programu GC ChemStation B04.03 a takto získaná data byla dále statisticky zpracována pomocí softwaru MS Excel 2021 a Statistica 14.

3 Výsledky

Analyzováno bylo celkem 30 vzorků placent, 15 fyziologických a 15 patologických. V chromatogramech byly zintegrovány plochy píků celkem 12 mastných kyselin (viz **Tabulka 3**). Následně byl proveden přepočítání koncentrací dle navážky vzorků placentární tkáně a výsledné hladiny mastných kyselin byly použity k porovnání MK ve fyziologických a patologických vzorcích. Výsledné koncentrace byly použity k výpočtu aktivity $\Delta 5$, $\Delta 6$ a $\Delta 9$ desaturáz. Grafy pro porovnání MK v jednotlivých frakcích lipidů a aktivity desaturáz byly zpracovány v MS Excel 2021.

Bodové grafy závislosti patologické (P) a fyziologické (F) MK byly vytvořeny v programu Statistica 14. Použity byly pouze ty s významností $p < 0,05$.

Tabulka 3: Seznam analyzovaných MK

Název mastné kyseliny	Vzorec
Kyselina myristová	C14:0
Kyselina palmitová	C16:0
Kyselina stearová	C18:0
Kyselina olejová	C18:1 n-9
Kyselina linolová	C18:2 n-6
Kyselina γ -linolenová	C18:3 n-6
Kyselina α -linolenová	C18:3 n-3
Kyselina dihomo- γ -linolenová	C20:3 n-6
Kyselina arachidonová	C20:4 n-6
Kyselina eikosapentaenová	C20:5 n-3
Kyselina nervonová	C24:1 n-9
Kyselina dokosaheptaenová	C22:6 n-3

3.1 Kalibrační křivka

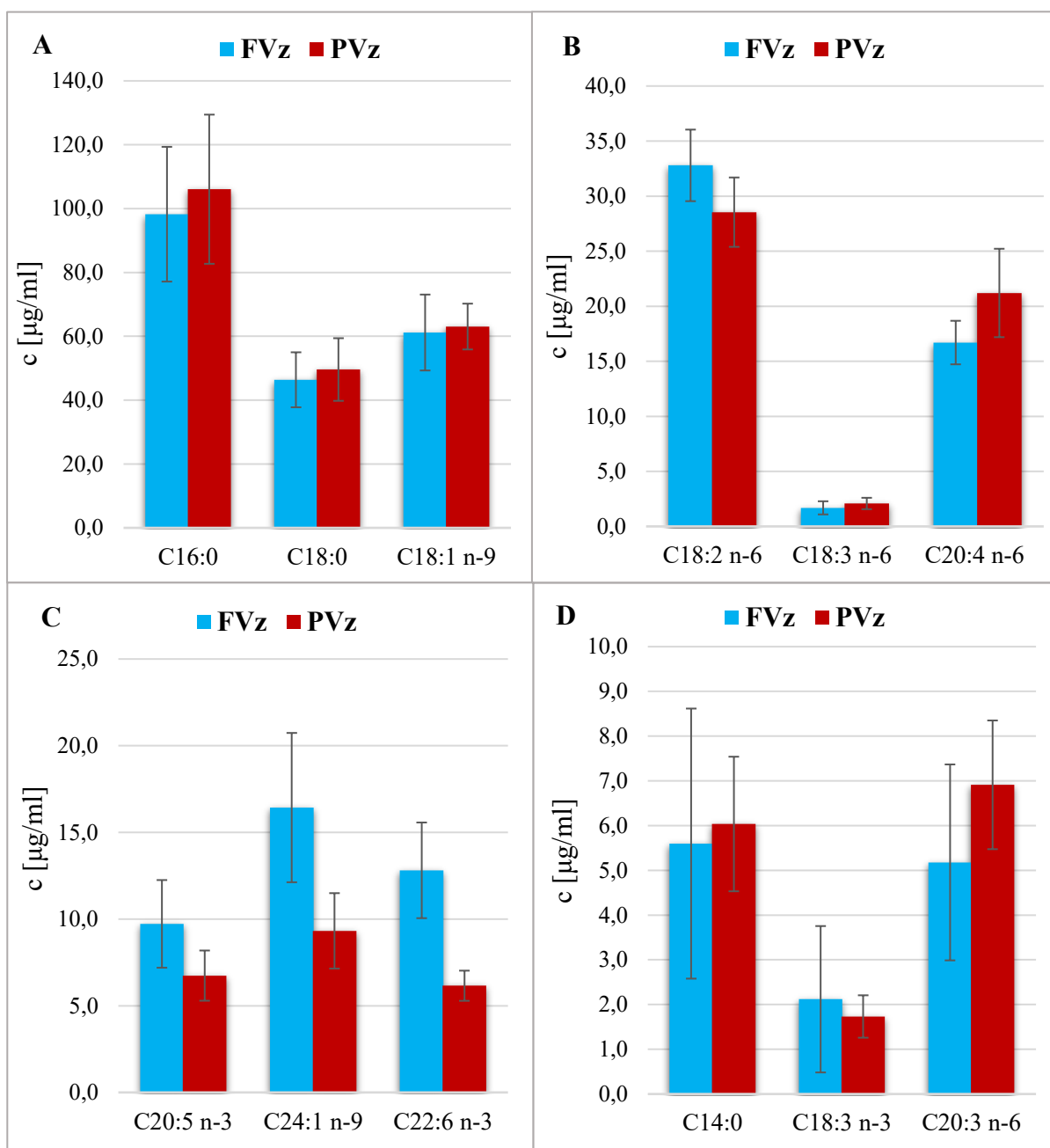
V programu Excel 2021 byla vytvořena kalibrační křivka pro vybrané analyzované mastné kyseliny. V **Tabulce 4** jsou uvedeny korelační koeficienty a směrnice lineární regrese.

Tabulka 4: Parametry kalibrační křivky

Mastná kyselina	Vzorec	R ²	Rovnice regrese
Myristová k.	C14:0	0,9868	$y = 0,0435x - 0,0166$
Palmitová k.	C16:0	0,9781	$y = 0,0379x - 0,2463$
Stearová k.	C18:0	0,9711	$y = 0,041x + 0,1709$
Olejová k.	C18:1 n-9	0,995	$y = 0,0468x - 0,1244$
Linolová k.	C18:2 n-6	0,9944	$y = 0,0445x + 0,0529$
γ-linolenová k.	C18:3 n-6	0,9977	$y = 0,0023x - 0,0002$
α-linolenová k.	C18:3 n-3	0,9901	$y = 0,009x + 0,0051$
Dihomo-γ-linolenová k.	C20:3 n-6	0,9897	$y = 0,0202x + 0,0049$
Arachidonová k.	C20:4 n-6	0,9932	$y = 0,032x + 0,0204$
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	0,9894	$y = 0,0866x - 0,0026$
Nervonová k.	C24:1 n-9	0,9975	$y = 0,0099x + 0,0014$
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	0,9922	$y = 0,0355x + 0,0032$

3.2 Frakce fosfolipidů

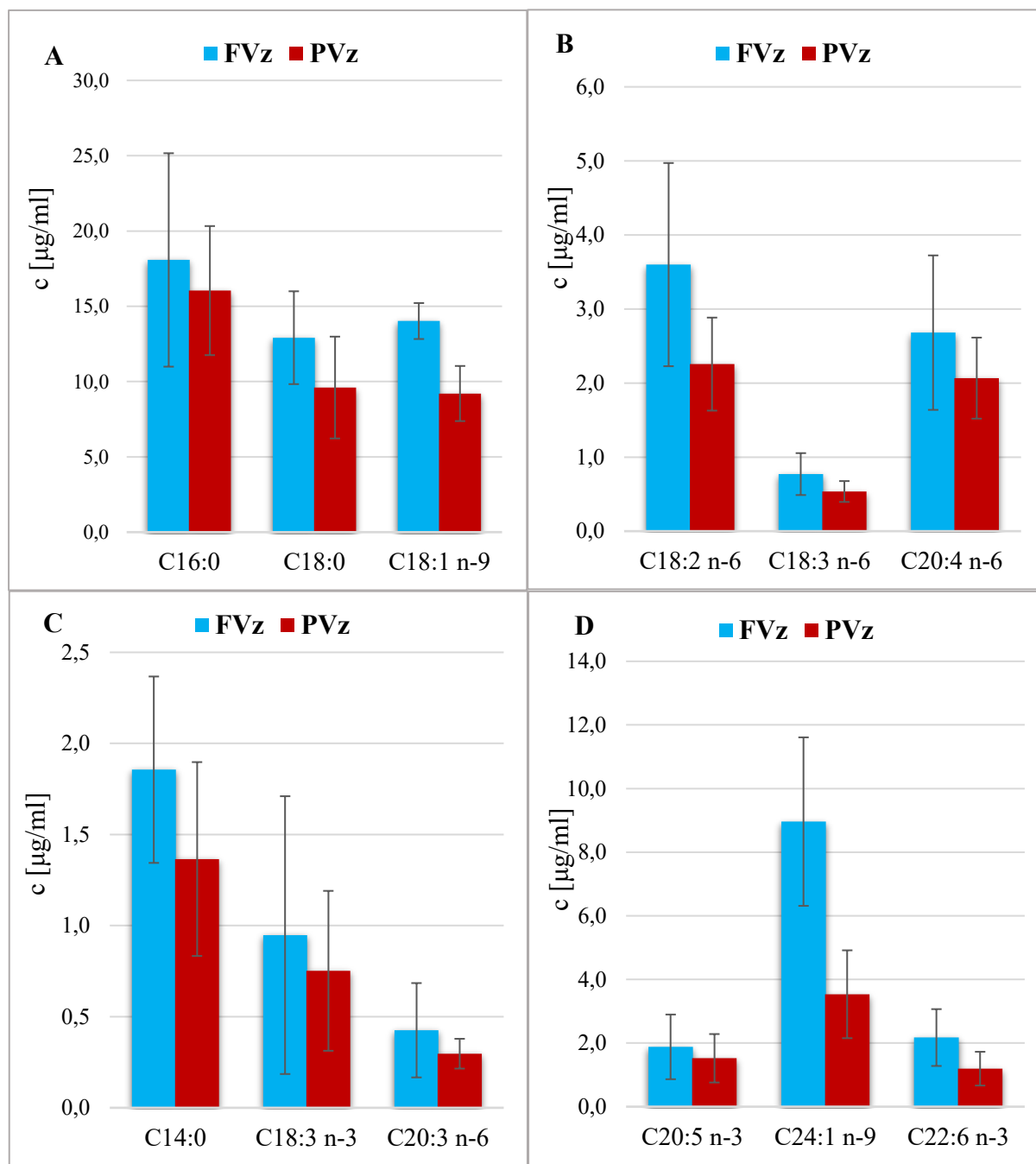
V níže uvedeném Grafu 1 byly patrné nižší koncentrace n-3 MK u patologických vzorků. Koncentrace n-6 MK, jmenovitě arachidonové a dihomo-γ-linolenové, byly u patologických vzorků zvýšené, naopak kyselina linolová byla snížena. Nasycené mastné kyseliny (myristová, palmitová a stearová) byly zvýšené u patologických vzorků.



Graf 1: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci fosfolipidů

3.3 Frakce diacylglycerolů

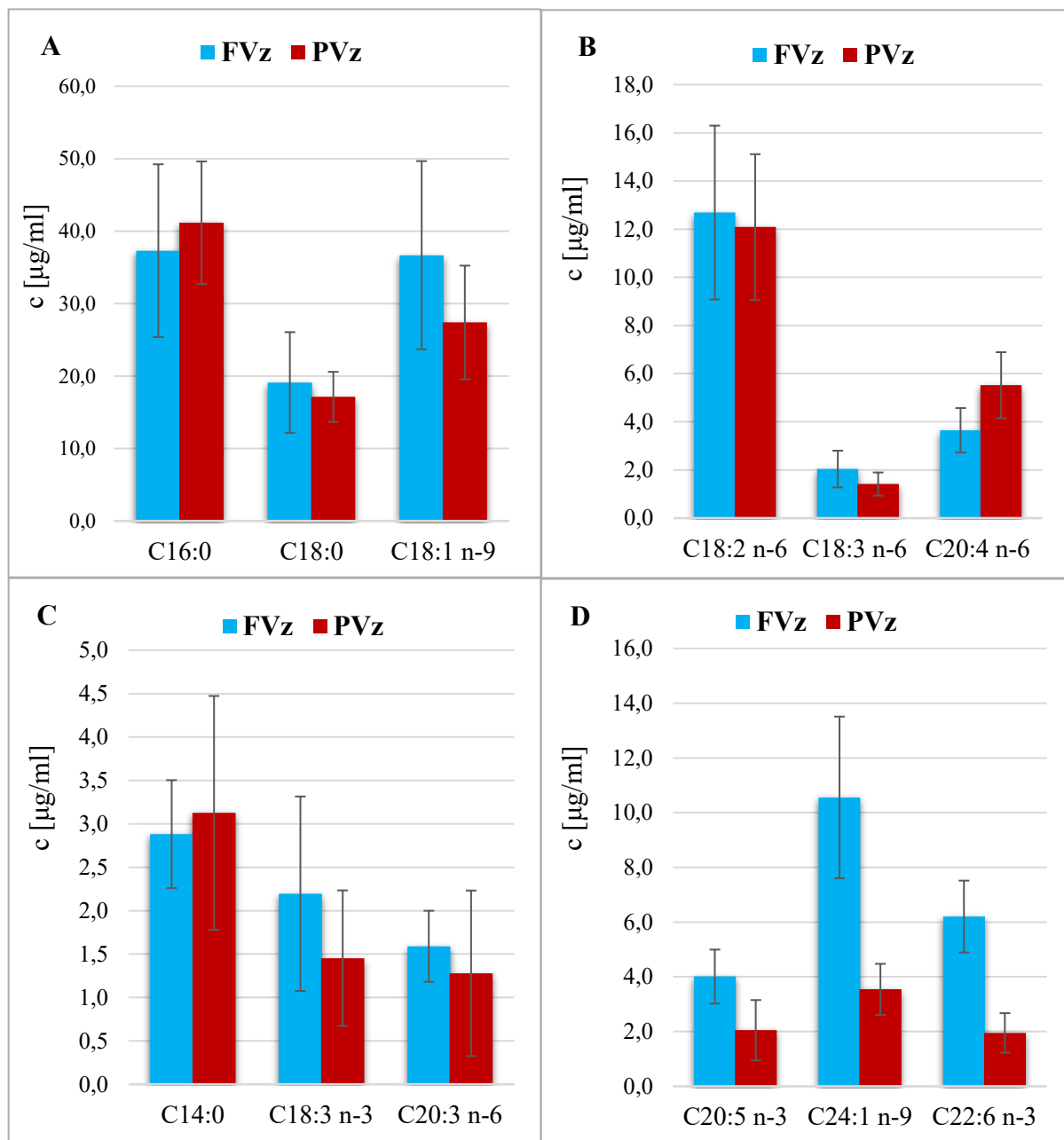
Ve frakci diacylglycerolů bylo dle Grafu 2 pozorováno, na rozdíl od předchozí frakce fosfolipidů, snížení koncentrací u všech vybraných MK. Zde byla snížena i kyselina arachidonová.



Graf 2: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci diacylglycerolů

3.4 Frakce volných mastných kyselin

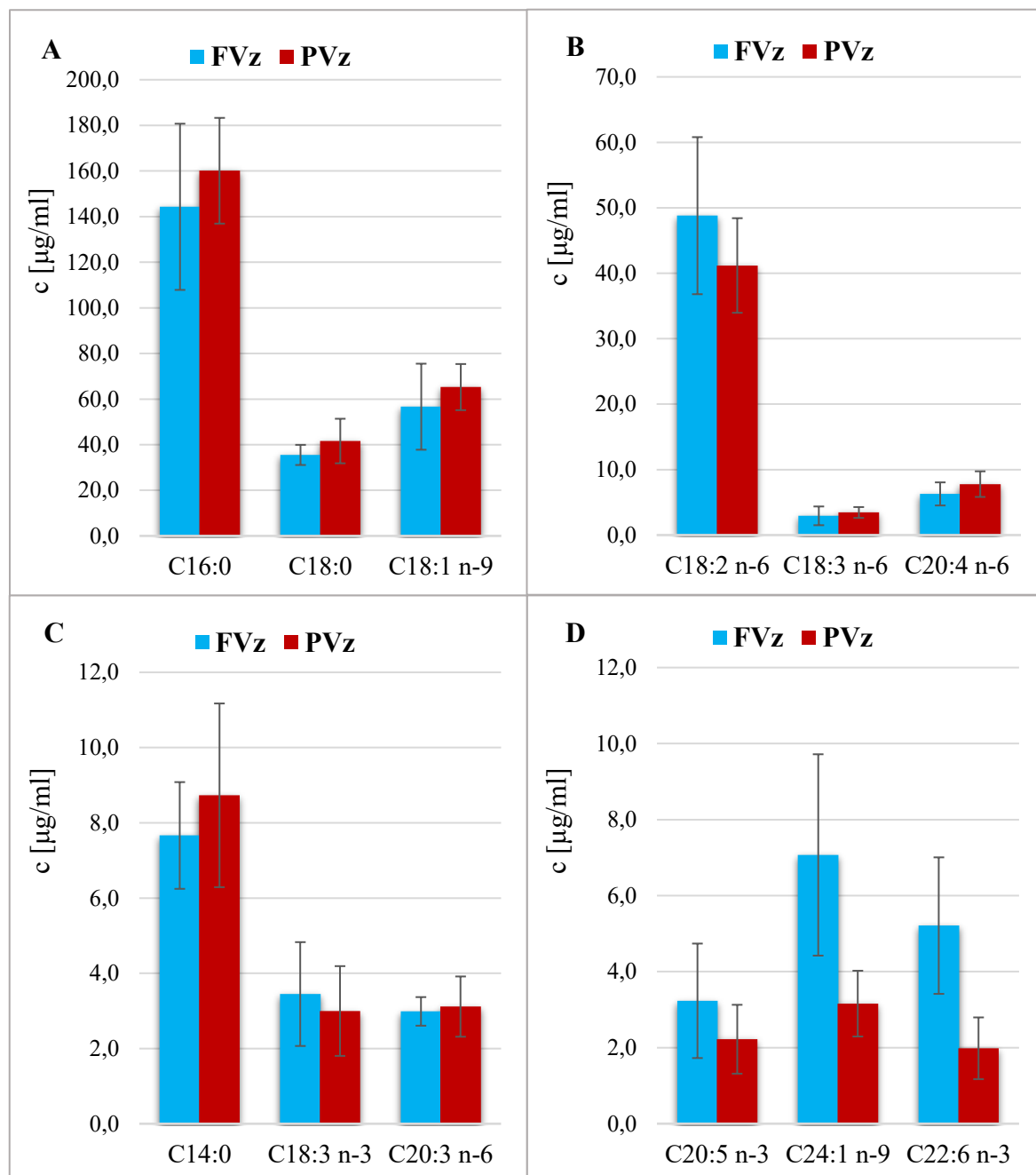
V Grafu 3 lze pozorovat podobný stav jako u frakce DG, tedy snížení koncentrací MK u patologických vzorků. Oproti frakci DG je zde ale zvýšená kyselina arachidonová. Nasycené mastné kyseliny byly ve zvýšené koncentraci, kyselina stearová byla mírně snížena u patologických vzorků.



Graf 3: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci volných mastných kyselin

3.5 Frakce triacylglycerolů

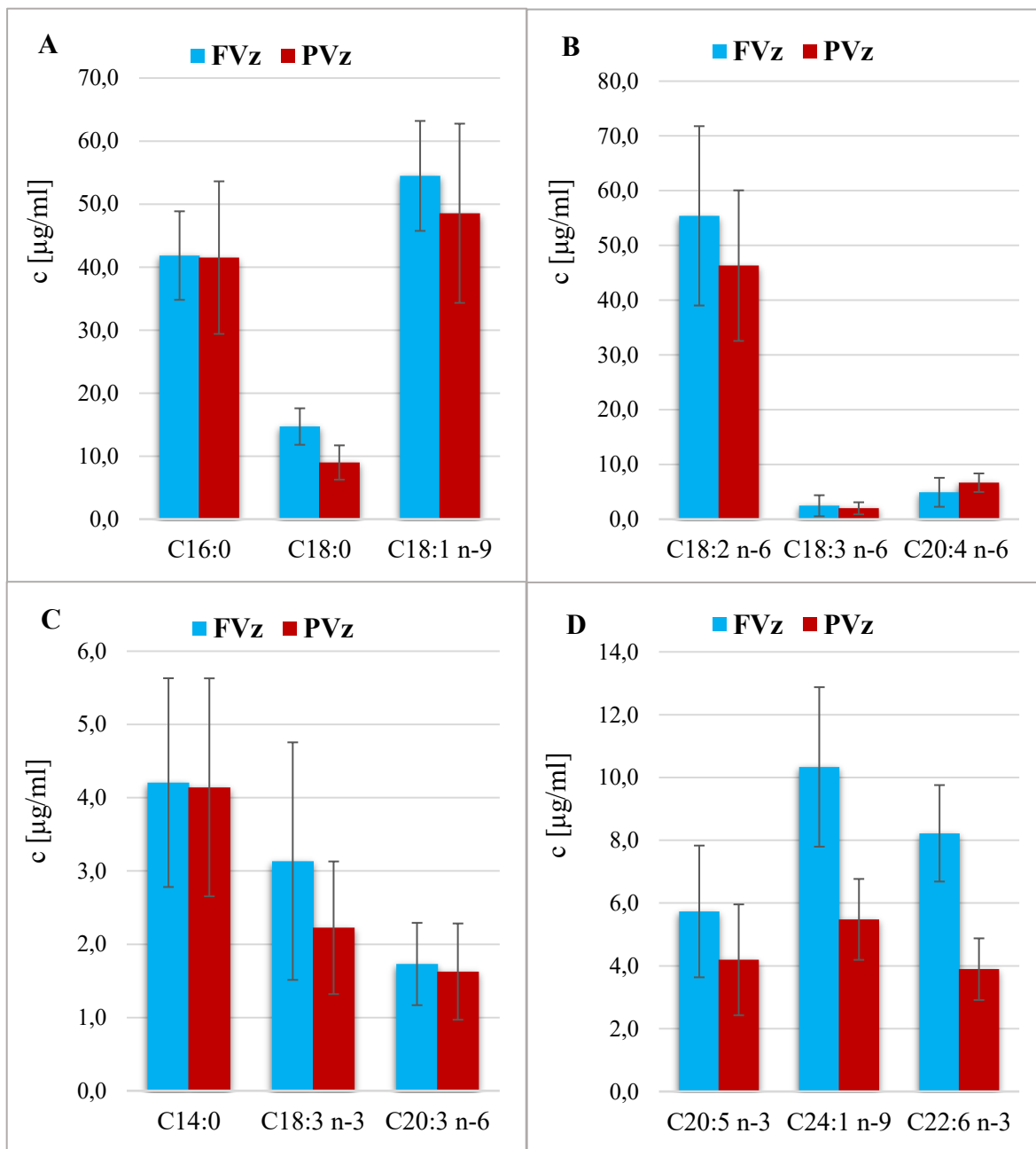
V následujícím Grafu 4 byly opět patrné snížené koncentrace n-3 MK u patologických vzorků. Koncentrace nasycených MK a kyseliny olejové byly u patologických vzorků zvýšené. Kyseliny γ -linolenová, dihomo- γ -linolenová a arachidonová zde byly zvýšené u patologických vzorků.



Graf 4: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci triacylglycerolů

3.6 Frakce esterů cholesterolu

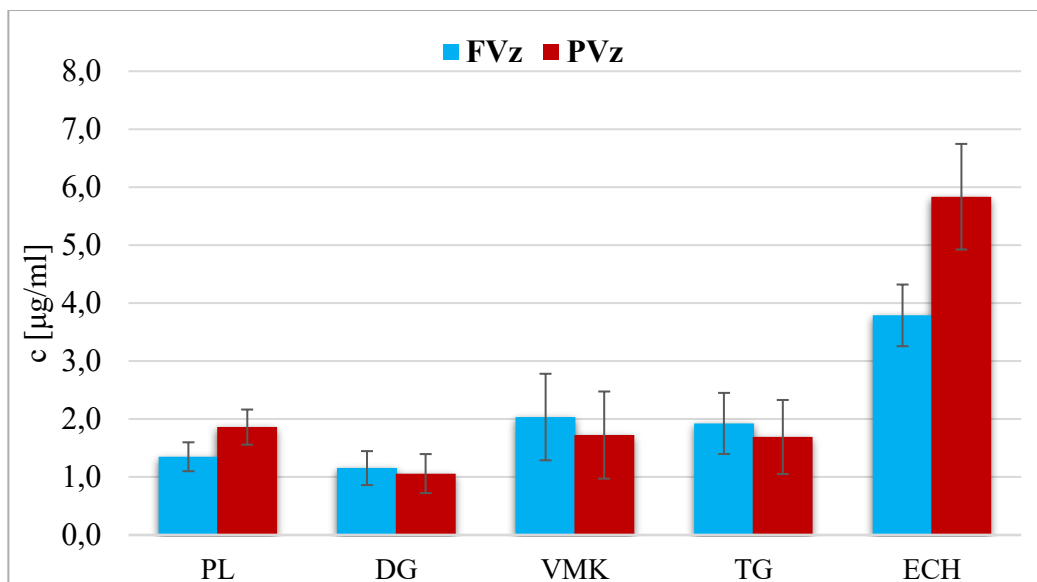
V Grafu 5 bylo pozorováno, podobně jako u předchozích frakcí, snížení n-3 MK v patologických vzorcích. Nasycené mastné kyseliny (kromě kyseliny stearové) byly v podobných koncentracích. Kyselina arachidonová byla mírně zvýšená u patologických vzorků, zbylé n-6 MK měly podobné koncentrace.



Graf 5: Poměr koncentrací MK ve FVz a PVz ve frakci esterů cholesterolu

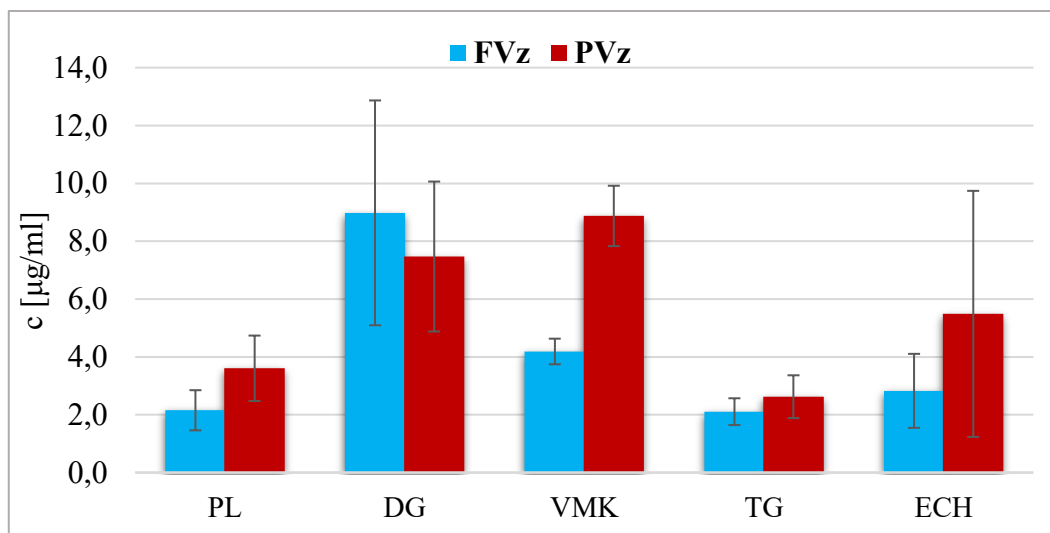
3.7 Aktivity desaturáz

V následujícím Grafu 6 byla pozorována aktivita $\Delta 9$ -desaturázy, a to ve všech lipidových frakcích u obou sledovaných skupin. Aktivita byla zvýšená u frakcí PL a ECH u patologických vzorcích. Naopak u frakcí je DG, VMK a TG je aktivita zvýšená u fyziologických vzorků.



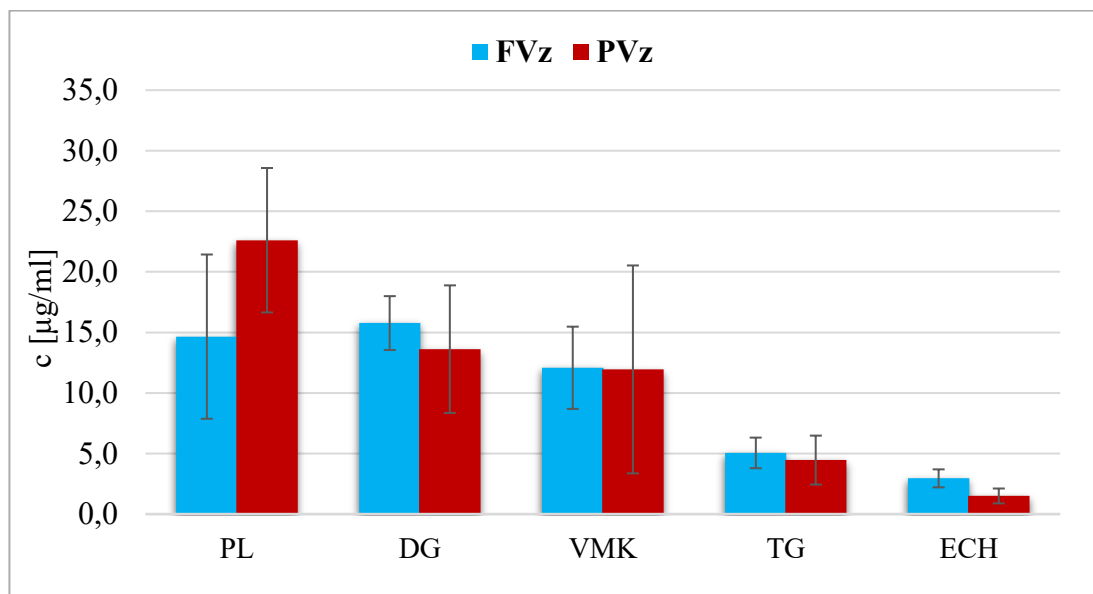
Graf 6: Průměrné aktivity $\Delta 9$ -desaturázy

V Grafu 7, kde byla pozorována aktivita $\Delta 5$ -desaturázy, je patrná vyšší aktivita v patologických vzorcích ve frakcích PL, VMK, DG a ECH. V jediné frakci DG byla pozorována aktivita vyšší u fyziologických vzorků.



Graf 7: Průměrné aktivity $\Delta 5$ -desaturázy

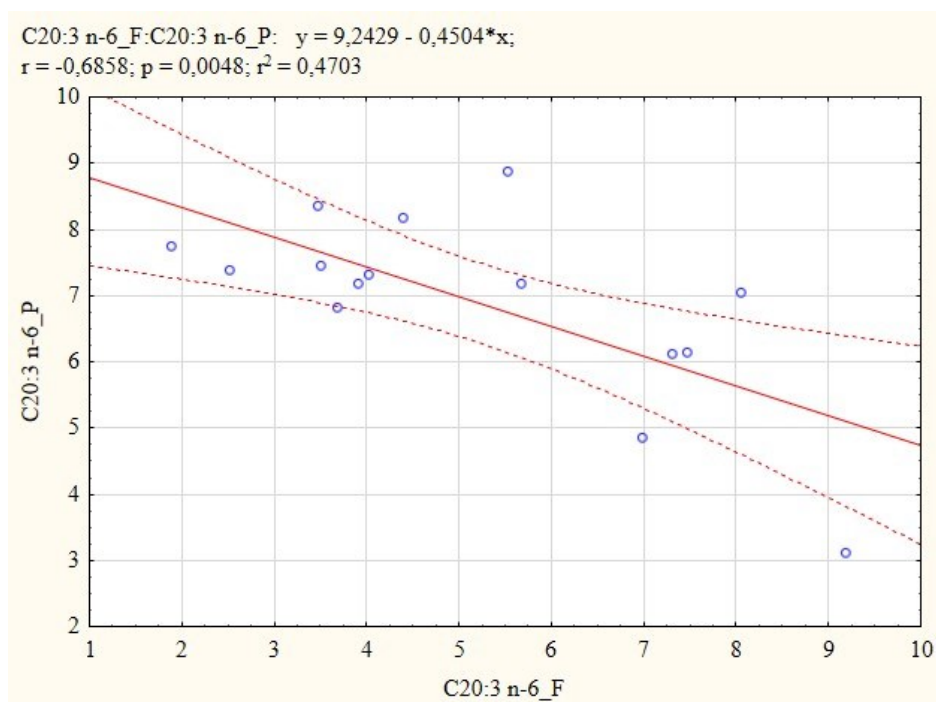
V následujícím Grafu 8 byl pozorován sestupný trend aktivity $\Delta 6$ -desaturázy. Ve frakcích DG, VMK, TG a ECH byla zvýšená aktivita $\Delta 6$ -desaturázy ve fyziologických vzorcích. Aktivita ve frakci PL byla zvýšená pouze u patologických vzorků.



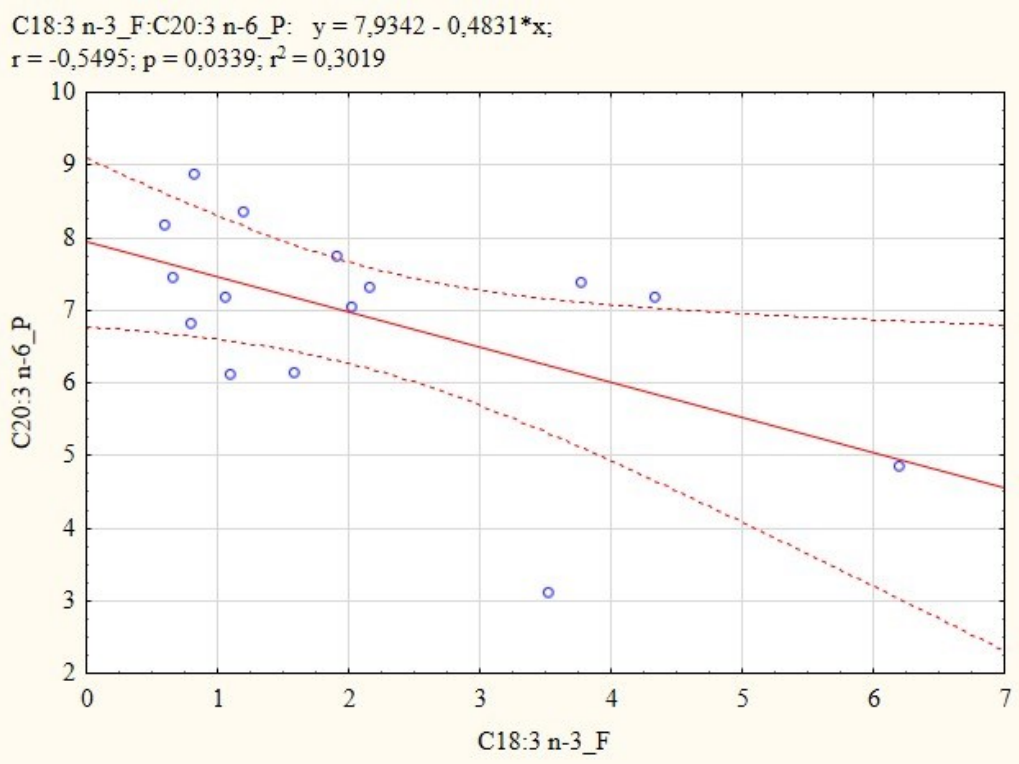
Graf 8: Průměrné aktivity $\Delta 6$ -desaturázy

3.8 Bodové grafy

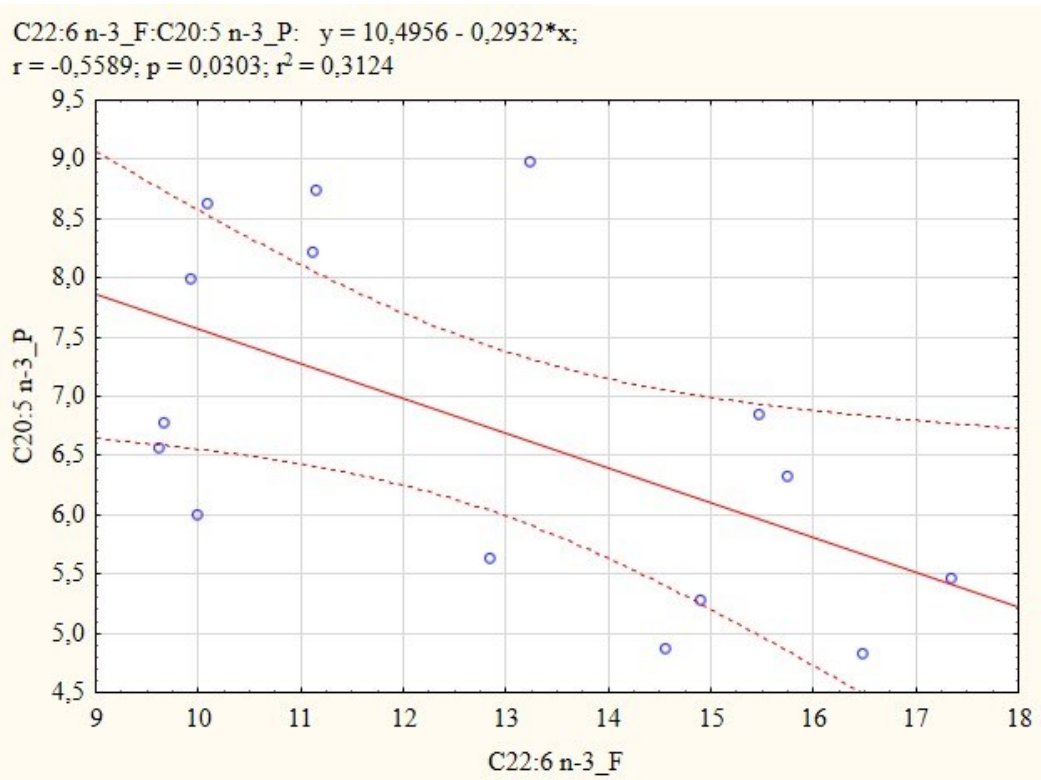
3.8.1 Frakce fosfolipidů



Graf 9: Bodový graf závislosti DGLA (F) na DGLA (P)

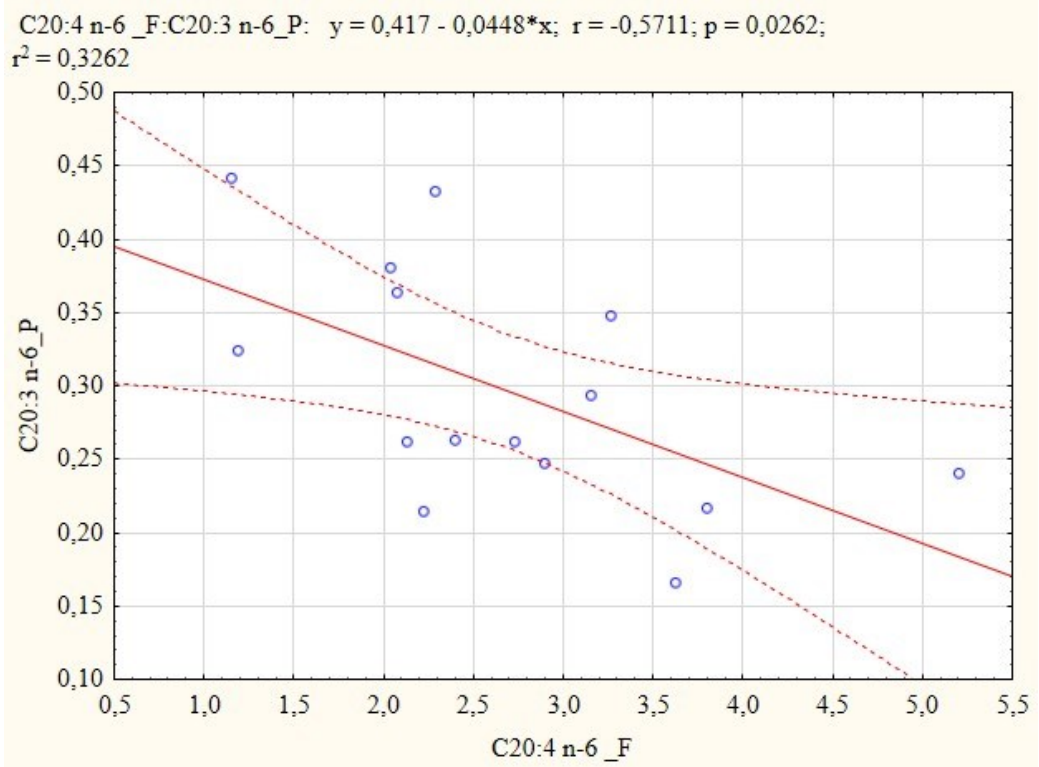


Graf 10: Bodový graf závislosti GLA (F) na DGLA (P)

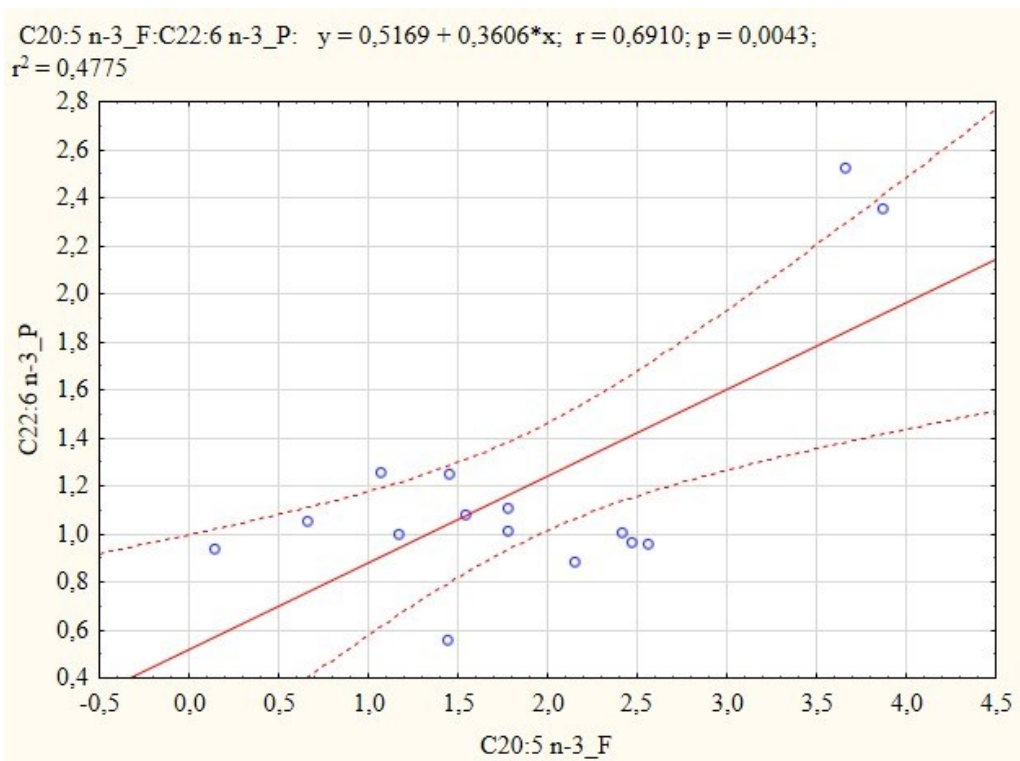


Graf 11: Bodový graf závislosti DHA (F) na EPA (P)

3.8.2 Frakce diacylglycerolů



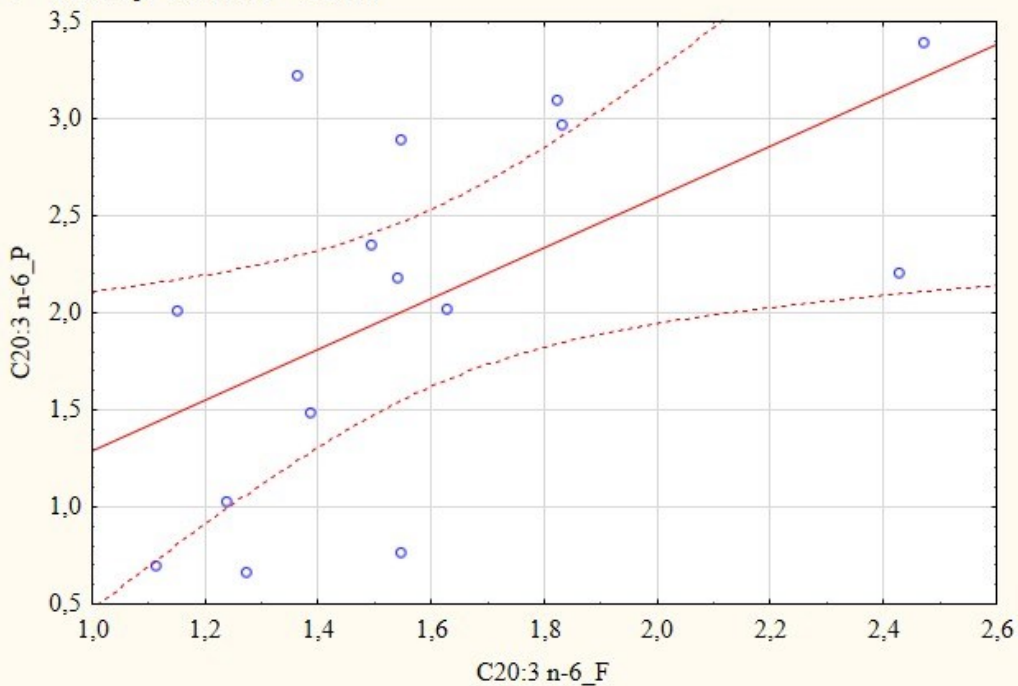
Graf 12: Bodový graf závislosti ARA (F) na DGLA (P)



Graf 13: Bodový graf závislosti EPA (F) na DHA (P)

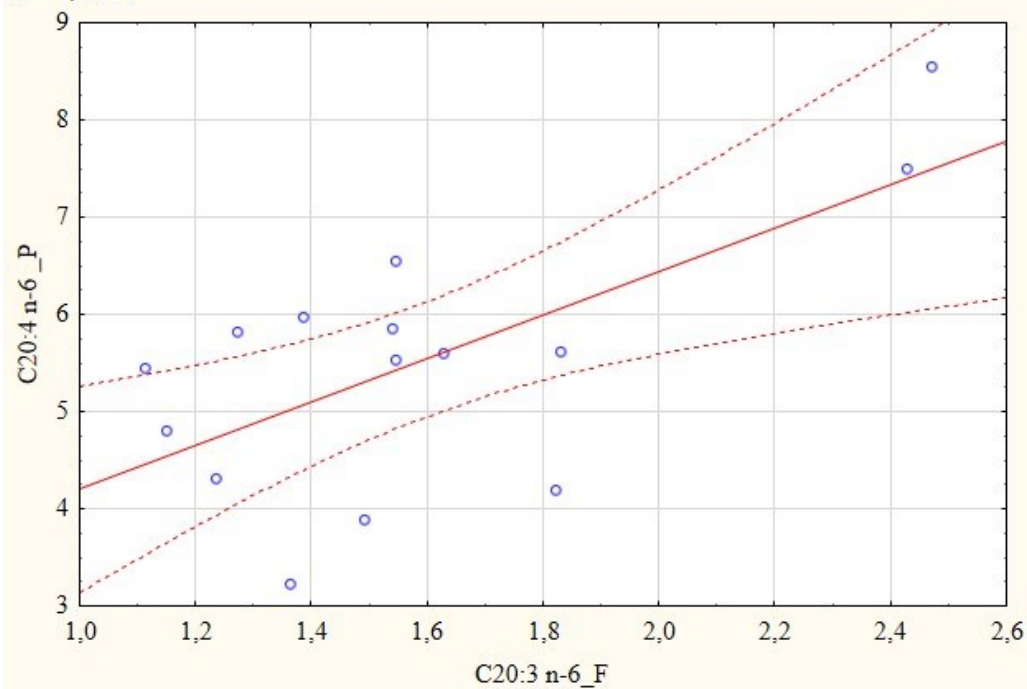
3.8.3 Frakce volných mastných kyselin

C20:3 n-6_F:C20:3 n-6_P: $y = -0,0168 + 1,3083*x$;
 $r = 0,5619$; $p = 0,0292$; $r^2 = 0,3158$



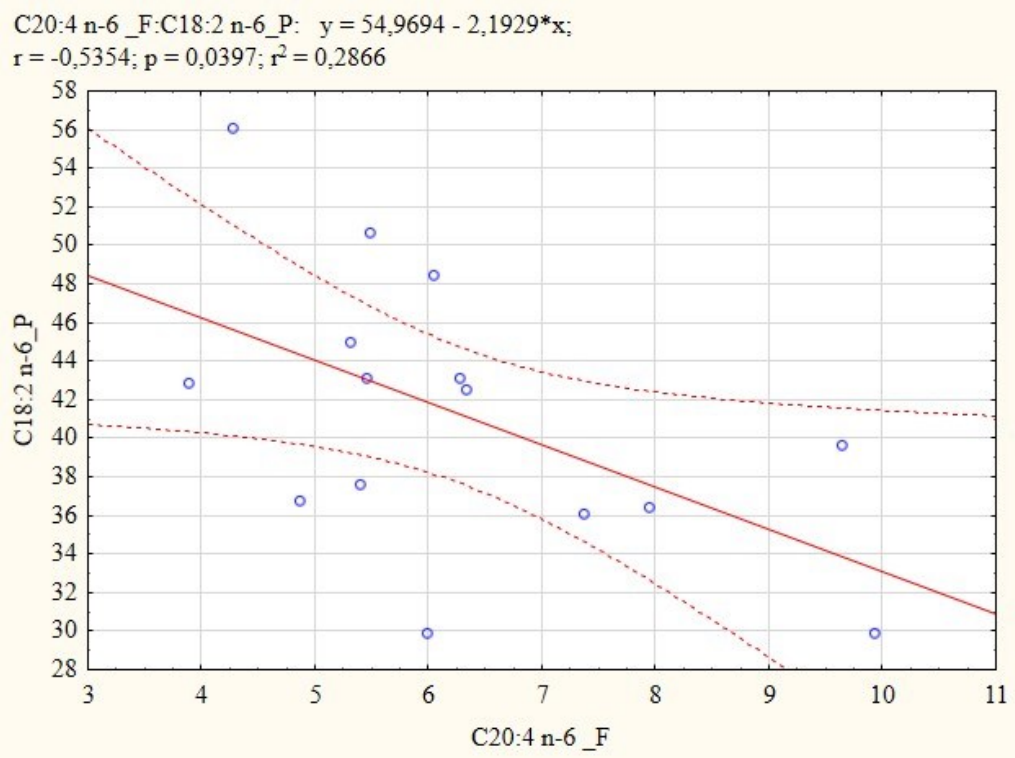
Graf 14: Bodový graf závislosti DGLA (F) na DGLA (P)

C20:3 n-6_F:C20:4 n-6_P: $y = 1,9609 + 2,2377*x$; $r = 0,6682$; $p = 0,0065$;
 $r^2 = 0,4465$

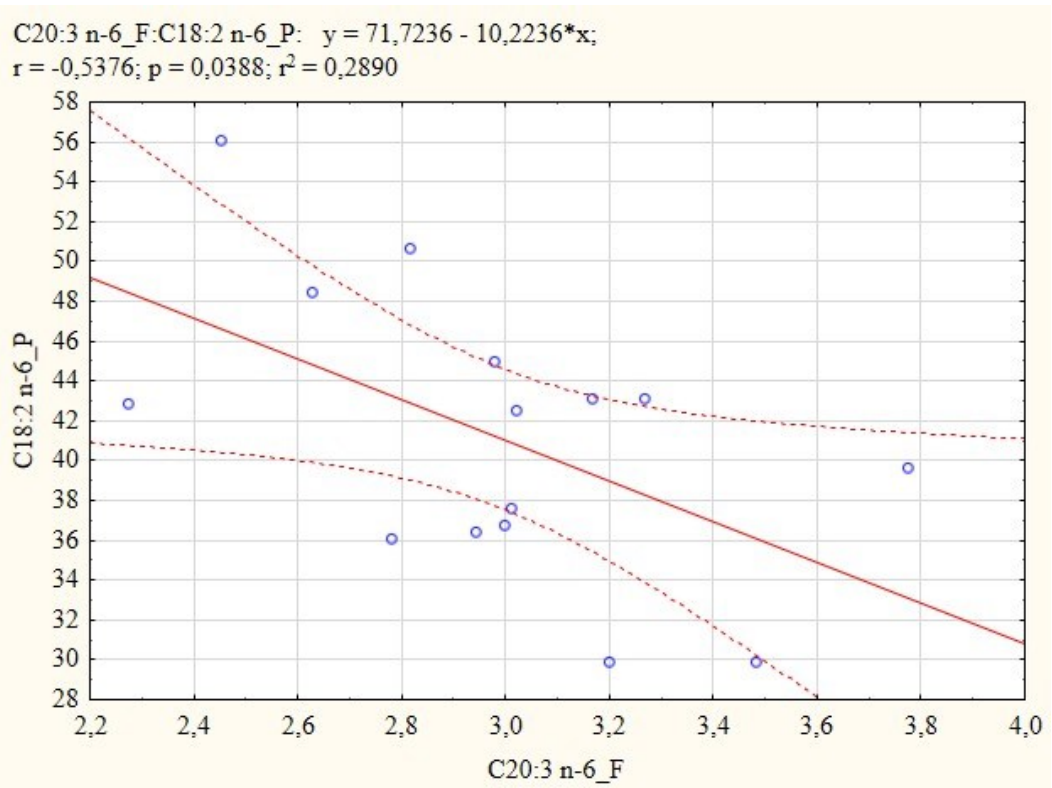


Graf 15: Bodový graf závislosti DGLA (F) na ARA (P)

3.8.4 Frakce triacylglycerolů

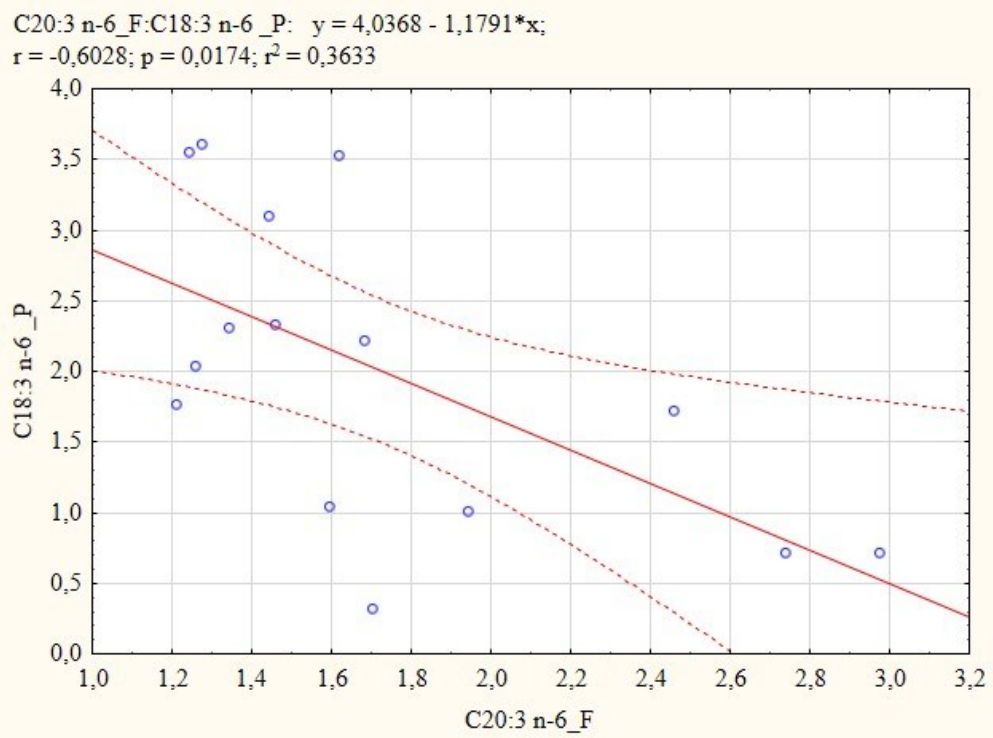


Graf 16: Bodový graf závislosti ARA (F) na LA (P)

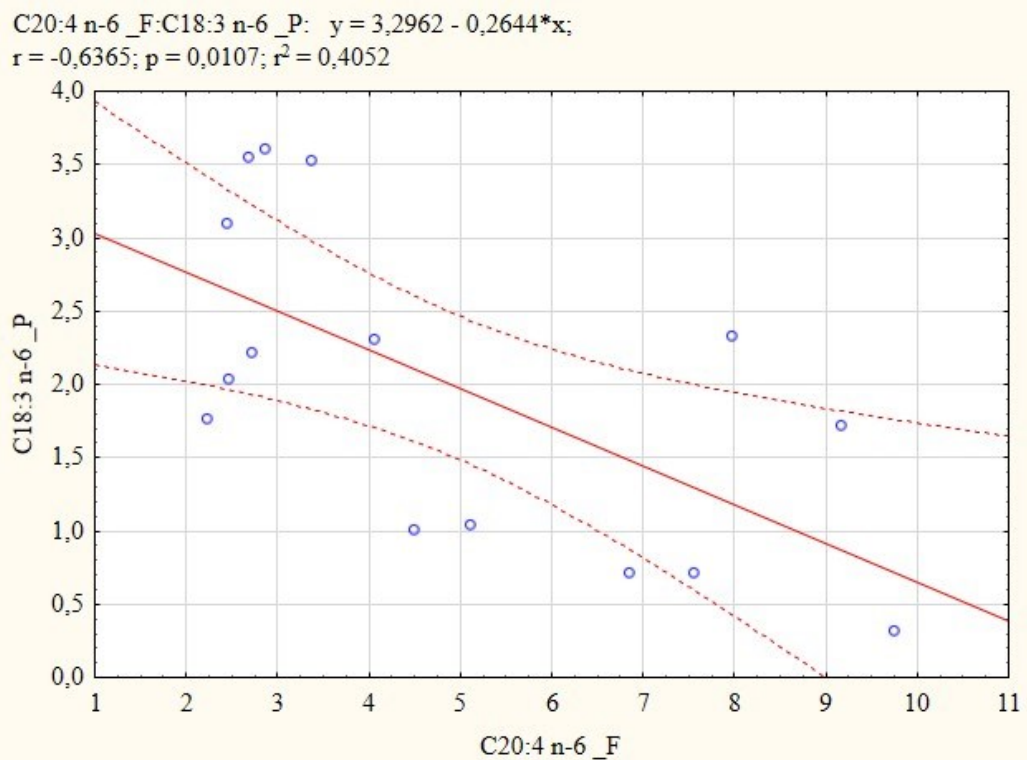


Graf 17: Bodový graf závislosti DGLA (F) na LA (P)

3.8.5 Frakce esterů cholesterolu



Graf 18: Bodový graf závislosti DGLA (F) na GLA (P)



Graf 19: Bodový graf závislosti ARA (F) na GLA (P)

4 Diskuze

V diplomové práci byly analyzovány fyziologické (FVz) a patologické vzorky (PVz) placentární tkáně. Fyziologické vzorky posloužily jako zdravá kontrola, patologické vzorky pocházely od pacientek, u kterých došlo ke spontánnímu potratu z neznámých příčin. Následně byly stanoveny koncentrace 12 MK. Cílem mé práce bylo porovnat koncentrace vybraných MK u fyziologických a patologických vzorků placent a následně zhodnotit získaná data. Stanoveny byly aktivity desaturáz, podílející se na syntéze LCPUFA.

Mastné kyseliny jsou důležitou strukturní a funkční součástí buněčných membrán, jsou substráty pro tvorbu signálních molekul (eikosanoidy) a ovlivňují expresi genů zapojených do udržení buněčné homeostázy. Zároveň jsou velmi důležité pro úspěšný průběh těhotenství a následný fyziologický vývoj plodu. LCPUFA mají největší podíl na průběh těhotenství. Hlavními enzymy zodpovědnými za metabolismus n-6 a n-3 mastných kyselin jsou desaturázy, elongázy, dále pak COX, LOX a systém cytochromu P450. Eikosanoidy jsou biologicky aktivní lipidy a zařazujeme mezi ně PG, TX, LT a HETE, které se podílejí na fyziologických i patologických procesech. [62]

Spontánní potraty (SP) jsou nejčastější těhotenskou komplikací. Přibližně 15 % všech těhotenství končí ztrátou těhotenství v období prvního trimestru. Přes velké pokroky v technologii oplodnění *in vitro* (IVF) je míra otěhotnění při IVF stále nízká (~25 %), a to především z důvodu neúspěšné implantace embrya. Opakované ztráty těhotenství, označované také jako opakované potraty (OP), jsou definovány jako 3 po sobě jdoucí těhotenské ztráty před 20. týdnem od poslední menstruace. Epidemiologické studie však odhalily, že 1 až 2 % žen zažívá OP. Existuje velké množství vyšetřovacích metod, ale až u poloviny případů se na příčinu SP nepříjde. [63] Mezi možné důvody SP zařazujeme např. chromozomální abnormality, nekontrolovaný DM, imunologické abnormality, metabolické poruchy, infekce, faktory prostředí nebo endokrinní poruchy. [64]

DHA je důležitou strukturální složkou buněk mozku a sítnice. V sítnici představuje DHA zhruba 80 % všech PUFA. Důležitá role DHA je ve vývoji mozku a spočívá v účasti na udržování membránové fluidity, šíření impulzů a synaptického přenosu. [35] DHA inhibuje tvorbu volných radikálů, čímž snižuje oxidační stres v placentě a zároveň udržuje zánětlivou rovnováhu tím, že zvyšuje syntézu protektinů a resolvinů. Tím zabraňuje agregaci

krvních destiček a adhezi molekul. Snížený oxidační stres a vyvážená zánětlivá reakce udržují pod kontrolou endoteliální buňky, což vede k normálnímu průběhu těhotenství. [65]

Ve FVz bylo pozorováno zvýšené množství n-3 EFA, a to zejména DHA a EPA oproti vzorkům patologickým, kde byly tyto MK sniženy, a to ve všech frakcích. Nejvyšší koncentrace těchto n-3 EFA byly ve frakci PL (viz **Graf 1 C, D**). Aktivita $\Delta 6$ -desaturázy byla zvýšená u PVz pouze ve frakci PL, ve zbylých frakcích byla desaturáza zvýšená u FVz (viz **Graf 8**). Enzym $\Delta 6$ -desaturáza se uplatňuje, spolu s elongázami, v syntéze LCPUFA řady n-3 a také n-6. Snižená aktivita u PVz mohla mít za následek sníženou syntézu DHA, a naopak zvýšená aktivita u FVz mohla vést k většímu uplatnění cesty n-3 a tvorbě DHA.

Ke snížení DHA mohla rovněž přispět placentární exprese mRNA proteinu MFSD2a (zodpovědný za transport DHA). Tento protein je snížený během těžké preeklampsie. [66] K PE dochází od 20. týdne těhotenství, může však nastat i dříve a způsobit mj. potrat. Celkově tato pozorování naznačují změnu transportu a metabolismu n-3 MK během PE. [24] Studie od Kulkarni *et al.* rovněž ukázala v placentární tkáni preeklamptických žen významně nižší hladiny DHA a n-3 MK ve srovnání s normálními kontrolami. [67]

Ze studií, o vlivu suplementace LCPUFA na dobu těhotenství, vyplývá, že suplementace n-3 MK snižuje riziko přerušení těhotenství a předčasného porodu. Význam suplementace n-3 MK během těhotenství spočívá také ve snížení rizika preeklampsie a těhotenstvím indukované hypertenze. [68]

Kyselina nervonová je důležitá n-9 MUFA obsažená ve sfingomyelinu a je nezbytná pro biosyntézu myelinu nervových buněk v mozku. Přírůstky kyseliny nervonové jsou dobrým markerem pro sledování myelinogeneze. [69] V této analýze byly hladiny NA nižší u patologických vzorků placentární tkáně, což je uváděno ve studiích patologických vzorků placent.

Implantace a placentace závisí na invazivních vlastnostech trofoblastu. Vzhledem ke svému zásadnímu vlivu na složení cévní stěny je tato invazivita důležitá pro zajištění dostatečného prokrvení placenty a podílí se na úspěšném průběhu těhotenství. K defektní invazi trofoblastu do děložních spirálních arterií dochází např. u PE, která je častou komplikací během těhotenství a může mít závažné až fatální důsledky pro plod i matku. [70]

Kyselina arachidonová je nejvíce obsažena ve fosfolipidech buněčné membrány, což potvrzuje i její nejvyšší koncentrace právě ve frakci PL (viz **Graf 1 B**). Působením fosfolipázy A2 se ARA uvolňuje z membrány a metabolizuje se na eikosanoidy. ARA a EPA jsou dva kompetitivní substráty COX a LOX. ARA může být za katalýzy COX metabolizována na PG (PGI₂, PGE₂, PGF₂α) a TXA₂ (jehož stabilním metabolitem je TXB₂) a za katalýzy LOX může být metabolizována na HETE a leukotrieny 4. řady (jako je LTB₄). [27] EPA může být za katalýzy COX metabolizována na PGE₃, PGI₃ a TXA₃ (jehož stabilním metabolitem je TXB₃) a za katalýzy LOX metabolizována na leukotrien 5. řady (jako je LTB₅). Eikosanoidy odvozené od ARA mají prozánětlivý účinek, který je mnohem výraznější než u těch odvozených od EPA, což je i jeden z důvodů protizánětlivého účinku n-3 PUFA. [29]

Počáteční stádia remodelace spirálních arterií napodobují angiogenezi a jsou zásadní pro proces placentace. Celý proces remodelace vyžaduje zánětlivé prostředí (působení prozánětlivých a protizánětlivých eikosanoidů), ale nadměrná aktivace může vést ke komplikacím, s potencionálně patologickým následkem (např. SP). Průběh zánětu je spojen s aktivací koagulačního systému, zvýšenou perfuzí a propustností cév a produkcí zánětlivých mediátorů, včetně derivátů ARA a LA. [71]

Jak n-3, tak n-6 MK se přímo či nepřímo podílejí na angiogenezi. Eikosanoidy produkované z ARA stimulují angiogenezi, zatímco eikosanoidy produkované z EPA a DHA ji inhibují. Eikosanoidy modulují angiogenní růstové faktory, buněčnou migraci, proliferaci a vaskularizaci. ARA má tudíž důležitou roli v ženské reprodukci a také SP. [72]

Prostaglandin E₂ (PGE₂) se podílí na angiogenezi tím, že nepřímo působí na různé typy buněk a produkuje proangiogenní faktory. PGE₂ zvyšuje produkci vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) nebo bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF), které následně působí na cílové endoteliální buňky a podporují angiogenezi. [73] TXA₂, další metabolit přeměny ARA, podporuje agregaci destiček, prokoagulaci a vazokonstrikci. TXA₂ a jeho receptor tromboxan A₂ receptor (TBXA₂R) ovlivňují regulaci cévního tonu přenos živin placentou z matky na plod. Jakmile je rovnováha TXA₂ a PG porušena, může dojít k trombu nebo sklonu ke krvácení. Trombóza způsobuje patologické změny v placentě, poškozují funkci jednotky plod-placenta, způsobuje ischemii, hypoxii, úmrtí plodu a následně dochází k potratu. [74] U hlodavců bylo zjištěno, že PGE₂ a PGF₂α hrají důležitou roli

v implantaci a decidualizaci, zatímco PGI₂ (prostacyklin) se podílí na implantaci a decidualizaci za účasti PPAR- δ . [75]

ARA byla zvýšená v patologických vzorcích ve frakcích PL, dále pak ve frakcích VMK, TG a ECH, snižena byla pouze ve frakci DG. Vyšší hladina ARA mohla vést ke zvýšené tvorbě zánětlivých PG. Následně mohlo dojít k porušení „fyziologického“ zánětlivého prostředí potřebného pro normální průběh těhotenství a např. spontánnímu potratu (viz **Obrázek 7**). Poznatky podporuje také zvýšená $\Delta 5$ -desaturáza (viz **Graf 7**) u PVz, která se podílí na syntéze ARA a EPA. Jelikož n-3 a n-6 soutěží o stejné desaturázy, je u PVz $\Delta 5$ -desaturáza více uplatněna u dráhy n-6 MK.

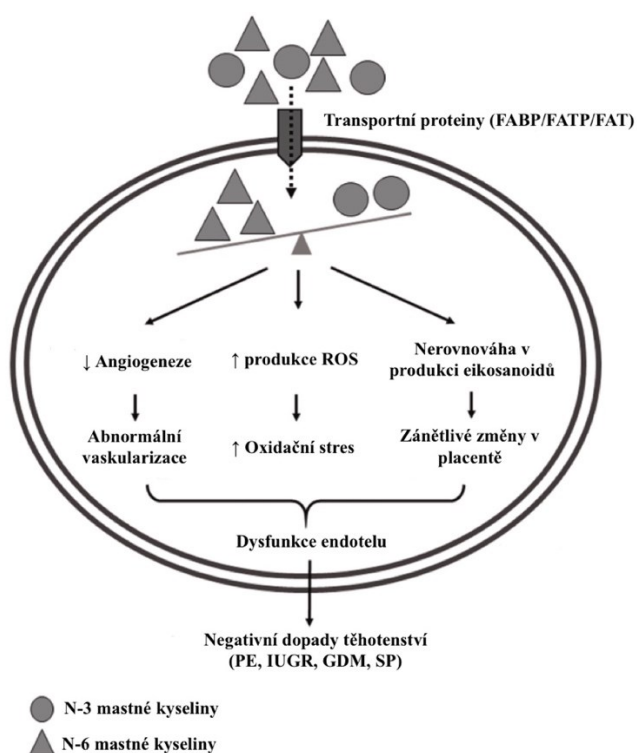
Jedním z poznatků studie, která se zabývala transkripční aktivitou genů pro $\Delta 5$ -desaturázu a $\Delta 6$ -desaturázu v placentární tkáni rozdílných skupin (fyziologické těhotenství, těhotenství komplikované IUGR a předčasným porodem), byla zvýšená exprese genů pro $\Delta 6$ -desaturázu. [76]

PGF₂ α i TXA₂ významně korelují s hladinou ARA. PGF₂ α , PGE₂ a TXA₂ byly prokázány významně zvýšené v plodové vodě pacientek, u kterých došlo k potratu. Metabolity ARA regulují děložní kontrakce. Přestože udržování zánětlivého stavu během těhotenství umožňuje matce tolerovat plod, nadměrná potence zánětu může vést k patologickému těhotenství. [77]

Placenta obsahuje také pozoruhodně vysoké množství ARA již od svého vzniku, což naznačuje její důležitou roli při udržování struktury, funkce a integrity buněčných membrán. Endotel zastává primární roli v placentární angiogenezi a organogenezi, ARA je hlavní UFA v lipidech vnitřní buněčné membrány lidského cévního endotelu. Vytvářející se membrány vyžadují během rychlého buněčného dělení, zvýšené invaze trofoblastu, vývoje a růstu plodu velké množství ARA. [78] Organogeneze je dokončena v 11.-12. týdnu gravidity. Po 12. týdnu se zvětšují mateřské tepny, jsou jasně ohraničené a zvyšuje se výrazně průtok krve. Existují také důkazy, že ARA, nikoli EPA nebo DHA, indukují diferenciaci děložních stromálních a deciduálních buněk. [79] Tyto poznatky mohou být také vysvětlení zvýšené koncentrace ARA v placentární tkáni, kdy docházelo k vývoji placenty, plodu a následně mohlo z neznámého důvodu dojít ke spontánnímu potratu.

Výsledky zvýšené koncentrace ARA, ale také snížené DHA, v potrácených placentách jsou v souladu se studii od Li *et al.* [29], Bitsanis *et al.* [23] a Sassin [80]. Snížené hodnoty ARA byly zaznamenány ve studii od Dhobale *et al.* Zde bylo snížené množství ARA u sledované skupiny oproti zdravým kontrolám. [81]

Ve studii Li *et al.* byl zjištěn vyšší poměr ARA/EPA a výrazně snížené hladiny 4 typů eikosanoidů (HEPE, LTB5, PGI2, TXB3). Vysoký poměr ARA/EPA může inhibovat produkci protizánětlivých eikosanoidů odvozených od EPA, čímž se zvyšuje úroveň zánětu, a nakonec přispívá ke SP. PGI2 je silný vazodilatátor a inhibitor agregace destiček, TXA2 může krevní destičky agregovat a je vazokonstriktorem. Předchozí studie ukázaly, že PGI2 a TXA2 mohou ovlivňovat přenos živin z placenty k plodu regulací vaskulární tenze, vyšší poměr PGI2/TXA2 může zvýšit průtok krve v placentě, a tím urychlit přenos živin. TXA3 (jehož stabilním metabolitem je TXB3) odvozený od EPA má také vazokonstriktční účinky, ale s menší účinností než TXA2. Vyšší poměr ARA/EPA proto může inhibovat přenos živin z matky k plodu snížením produkce TXA3 a PGI2, tento stav může být další příčinou SP. Zvýšený poměr ARA/EPA byl rovněž pozorován v mé analýze u PVz, konkrétně ve frakcích PL, VMK, TG a ECH. [29]



Obrázek 7: Vliv nerovnováhy n-6 a n-3 LCPUFA [65]

Ve studii Li *et al.* bylo rovněž zjištěno, že koncentrace ALA a LA v deciduální a vilózní tkáni placenty a celková hladina n-3 PUFA v deciduální tkáni byla ve skupině SP výrazně nižší než v kontrolní skupině. [29] Tento poznatek se také shoduje s mou analýzou, kde koncentrace ALA, LA a n-3 PUFA byly snižené u PVz ve všech lipidových frakcích.

Abnormální hladiny COX-2 jsou spojeny se selháním ovulace, neplodností a poruchami implantace. V modelové studii na potkanech bylo prokázáno, že hladiny PG a metabolitů ARA byly významně vyšší v ovariální tkáni skupiny s PCOS než v kontrolní skupině zdravých jedinců. [34] Ženy s PCOS mají až třikrát větší pravděpodobnost potratu v raných stádiích těhotenství, tudíž zvýšené koncentrace ARA v PVz mohly být právě důsledkem SP.

Těhotné ženy s nadváhou a obezitou jsou vystaveny zvýšenému riziku potratu, ať už početí proběhlo přirozenou cestou, nebo s pomocí asistované reprodukce [82]. Obezita matek, která postihuje téměř každé čtvrté těhotenství, je spojena se zvýšenou cirkulací nasycených mastných kyselin (např. kyselina palmitová) a tyto mastné kyseliny se podílejí na zánětu a dysfunkci placenty. Komorbidity obezity v placentě jako palmitoylace a hypoxie mohou způsobit stres endoplazmatického retikula, který následně ovlivňuje apoptózu buněk a autofagii. Yang *et al.* zjistili u primárních lidských trofoblastů, že PA a SA indukují prozánětlivé cytokiny TNF- α , IL-6 a IL-8, zatímco nenasycené mastné kyseliny (OA a LA) nikoli. [83] Celkové koncentrace SFA (jmenovitě PA, SA a MA) byly zvýšené, OA a LA naopak snižené u PVz. Výše zmíněný poznatek a výsledné zvýšené koncentrace SFA u PVz mohly podporovat progresi zánětu, který je spojován se SP.

Nadbytek PA může zvýšit expresi klíčových autofagosomových genů, ale zároveň potlačuje fúzi autofagosomu a lysosomu, což způsobuje poruchy autofagie, nahromadění těchto produktů může vyvolat stres endoplazmatického retikula (ER). Nekontrolovaný stres ER může spustit apoptotické dráhy buněčné smrti v buňkách placenty. PA může také snižovat protizánětlivou tvorbu lipidových kapének. [84]

Ve frakcích PL a ECH u PVz byla zvýšená aktivita $\Delta 9$ -desaturázy (viz **Graf 6**), která syntetizuje OA z SA. Vyšší koncentrace OA ve frakci PL u PVz korelovala se zvýšenou aktivitou $\Delta 9$ -desaturázy. U ECH byla aktivita vyšší, ale zároveň nižší OA, opakem tomu bylo také u frakce TG, kde byla vyšší koncentrace OA a nižší aktivita desaturázy.

Diacylglyceroly mohou působit jako druhý posel aktivace proteinkinázy C (PKC). PKC má zásadní význam pro normální embryonální vývoj. Ve studii Li *et al.* byly ve vilózní tkáni znatelně nižší koncentrace diacylglycerolů u případů potratu než v kontrolní skupině. [29] Studie na zvířatech provedená Ma *et al.* ukázala, že vyřazení genu kódujícího PKC δ může vést ke snížení počtu potencionálních míst vhodných k implantaci a zvýšení úmrtnosti embryí. [85] Ve frakci DG u PVz byly snižené koncentrace všech vybraných MK. Z výše zmíněné studie Ma *et al.* může vyplývat, že nízká hladina diacylglycerolů ve vilózní tkáni potracených placent brání signální dráze PKC a přispívá tím k SP.

Statistická analýza byla provedena porovnáním fyziologických a patologických mastných kyselin, za významné se považovaly hodnoty $p < 0,05$. Tato analýza potvrdila vzájemnou statistickou významnost mastných kyselin. V bodových grafech byla ve všech frakcích statisticky významná kyselina dihomog- γ -linolenová. Kyselina arachidonová byla statisticky významná ve frakcích DG, VMK, TG a ECH. N-3 MK (DHA a EPA) byly významné ve frakcích PL, DG a ECH. Kyselina linolová byla statisticky významná ve frakci TG.

ZÁVĚR

V diplomové práci bylo analyzováno celkem 30 vzorků placentární tkáně, 15 fyziologických, které posloužily jako zdravé kontroly, a 15 patologických vzorků od pacientek, u kterých došlo ke spontánnímu potratu z neznámých příčin.

Vzorky placent byly zhomogenizovány a technikou tenkovrstvé chromatografie rozděleny do 5 lipidových tříd – fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu. Následně byly vzorky převedeny na FAME a analyzovány pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Programem MS Excel 2021 byly z výsledných dat vytvořeny grafy zobrazující závislost koncentrací vybraných MK mezi fyziologickými a patologickými vzorky. Dále byla provedena statistická analýza programem Statistica 14.

Z výsledků analýzy byl patrný celkový pokles n-3 mastných kyselin u patologických vzorků, a to ve všech lipidových frakcích. ALA a LA jsou esenciální mastné kyseliny a musí být přijímány potravou. ALA může být metabolizována na n-3 LCPUFA (EPA, DHA) desaturací, elongací a β -oxidací, zatímco LA může být metabolizována na n-6 LCPUFA, jako je ARA. DHA je důležitou strukturní složkou nervového systému a sítnice. Nižší koncentrace ALA a LA v patologických vzorcích placenty mohou vést k nedostatečné syntéze LCPUFA, bránit normálnímu embryonálnímu vývoji, což může mít za následek SP. Jelikož byla EPA ve vyšší koncentraci u PVz než DHA, lze předpokládat, že vlivem snížené aktivity $\Delta 6$ -desaturázy docházelo k neefektivní syntéze DHA. Ženy, u kterých se během těhotenství rozvine preeklampsie, mají sníženou expresi mRNA transportního proteinu pro DHA MFSD2a, tento stav mohl také přispět ke snížení DHA u PVz.

Ve frakcích PL, VMK, TG a ECH byla zvýšená ARA. Tato MK je prekurzor pro eikosanoidy podílející se na udržení „fyziologického“ zánětlivého prostředí, který je nutný pro úspěšnou implantaci embrya. Prostaglandiny (PGI₂, PGE₂, PGF₂ α – odvozené od ARA) se podílí na vaskulární permeabilitě, proliferaci buněk, decidualizaci a angiogenezi. Zvýšená koncentrace ARA mohla vést k nadměrné syntéze PG, a tím k větší potenci zánětu. Tento stav mohl vést k porušení prozánětlivého a protizánětlivého prostředí, a tím k patologickému průběhu těhotenství s následky, jako je předčasný porod nebo spontánní potrat. Pokud je porušena rovnováha mezi PG a TX₂ (také odvozený od ARA) může dojít v placentě ke vzniku trombu, způsobující ischemii, hypoxii a následně také potrat. Vysoké hladiny ARA

a PG jsou rovněž nalézány u žen s PCOS, pacientky s touto nemocí mají až třikrát větší riziko potratu.

Zvýšené koncentrace ARA v patologických vzorcích ve frakcích PL, VMK, TG a ECH potvrzuje také zvýšená aktivita $\Delta 5$ -desaturázy. Z analýzy vyplývá také zvýšený poměr ARA/EPA u patologických vzorků, kromě frakce DG. Tento nepoměr vede k inhibici produkce protizánětlivých eikosanoidů HEPE a LTB₅, odvozených od EPA, čímž zvyšují úroveň zánětu, a nakonec přispívají k výskytu SP. Zvýšený poměr ARA/EPA způsobuje také snížení produkce TXA₃ (odvozený od EPA) a ve spojení s vyšší produkcí PGI₂ ovlivňuje negativně přenos živin z placenty k plodu regulací vaskulární tenze. Metabolismus kyseliny arachidonové má potenciál být užitečným terapeutickým cílem při léčbě opakovaných potratů a zároveň zkoumán v rámci diagnostiky.

Vyšší koncentrace nasycených mastných kyselin u patologických vzorků (PA, SA, MA) mohly přispívat k rozvoji zánětu zvýšenou tvorbou prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-6 a IL-8). Zvýšená PA v patologických vzorcích může potencionálně snížit tvorbu protizánětlivých lipidových kapének a zároveň zvyšovat stres endoplazmatického retikula a tím indukovat apoptózu. Zatímco OA může působit proti účinku kyseliny palmitové na tvorbu lipidových kapének v syncytiotrofoblastu a trofoblastu, kyselina olejová však byla u PVz snížena (frakce DG, VMK a ECH).

Ve frakcích PL a ECH u PVz byla zvýšená aktivita $\Delta 9$ -desaturázy, která syntetizuje OA z SA. Vyšší koncentrace OA ve frakci PL u PVz korelovala se zvýšenou aktivitou $\Delta 9$ -desaturázy, naopak tomu bylo u frakce ECH.

Výsledná data byla v souladu se studii patologických placent. Poznatky byly také podpořeny statistickou analýzou, která potvrdila statisticky významnou závislost fyziologických a patologických mastných kyselin.

Mastné kyseliny jsou důležitou strukturní a funkční součástí buněčných membrán, jsou substráty pro tvorbu signálních molekul a ovlivňují expresi genů zapojených do udržení buněčné homeostázy. Zároveň mají nezastupitelnou úlohu v úspěšném průběhu těhotenství a fyziologický vývoj embrya. Eikosanoidy mají největší vliv na průběh těhotenství, udržují balanc prozánětlivého a protizánětlivého prostředí. Nerovnováha může vést k fatálním následkům v podobě spontánního potratu. Složení stravy a příjem potravinových doplňků má velký podíl na celkovém obsahu mastných kyselin v těle budoucí matky.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Turco, M.Y. and A. Moffett, *Development of the human placenta*. Development, 2019. **146**(22).
2. Donnelly, L. and G. Campling, *Functions of the placenta*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 2016. **17**(7): p. 349-353.
3. Cappelletti, M., *et al.*, *Inflammation and preterm birth*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(1): p. 67-78.
4. Čech, E., *Porodnictví*. 2., přeprac. a dopl. vyd. 2006, Praga: Grada.
5. Sadler, T.W., *Langmanova lékařská embryologie*. 1. české vydání 2011, Praha: Grada.
6. Jansen, C., *et al.*, *Development of placental abnormalities in location and anatomy*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2020. **99**(8): p. 983-993.
7. Maître, J.L., *Mechanics of blastocyst morphogenesis*. Biol Cell, 2017. **109**(9): p. 323-338.
8. Huppertz, B., *The anatomy of the normal placenta*. J Clin Pathol, 2008. **61**(12): p. 1296-302.
9. Solnica-Krezel, L. and D.S. Sepich, *Gastrulation: making and shaping germ layers*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 687-717.
10. Anwar, A., A.M. Farhan, and T. ZALAT, *Placenta previa and risk of congenital malformations among singleton births*. Al-Azhar International Medical Journal, 2020. **1**(2): p. 183-178.
11. Morlando, M. and S. Collins, *Placenta Accreta Spectrum Disorders: Challenges, Risks, and Management Strategies*. Int J Womens Health, 2020. **12**: p. 1033-1045.
12. Rathbun, K.M. and J.P. Hildebrand, *Placenta Abnormalities*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing, Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
13. Taniguchi, H., *et al.*, *Circumvallate placenta: associated clinical manifestations and complications-a retrospective study*. Obstet Gynecol Int, 2014. **2014**: p. 986230.
14. Ravangard, S.F., K. Henderson, and K. Fuller, *Placenta membranacea*. Arch Gynecol Obstet, 2013. **288**(3): p. 709-12.

15. Donald Voet, J.G.V., Charlotte W. Pratt, *Fundamentals of Chemistry*. 1998, United States of America: John Wiley & Sons, Inc.
16. Koolman Jan, R.K.H., *Barevný atlas biochemie - Překlad 4. vydání*. 2012: Grada Publishing a.s.
17. Ridgway, N. and R. McLeod, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 2015: Elsevier Science.
18. Chow, C.K., *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. 2007: CRC Press.
19. Mennitti, L.V., *et al.*, *Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring*. J Nutr Biochem, 2015. **26**(2): p. 99-111.
20. Dhull, S.B., S. Punia, and K.S. Sandhu, *Essential Fatty Acids: Sources, Processing Effects, and Health Benefits*. 2020: CRC Press.
21. De Oliveira Cipriano Torres, D., *et al.*, *Effect of maternal diet rich in omega-6 and omega-9 fatty acids on the liver of LDL receptor-deficient mouse offspring*. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2010. **89**(2): p. 164-170.
22. Tokuda, N., *et al.*, *Omega-3 fatty acids transport through the placenta*. Asian Journal of Medical and Biological Research, 2016. **2**(1): p. 1-8.
23. Bitsanis, D., *et al.*, *Arachidonic acid predominates in the membrane phosphoglycerides of the early and term human placenta*. J Nutr, 2005. **135**(11): p. 2566-71.
24. Devarshi, P.P., *et al.*, *Maternal Omega-3 Nutrition, Placental Transfer and Fetal Brain Development in Gestational Diabetes and Preeclampsia*. Nutrients, 2019. **11**(5).
25. Szczuko, M., *et al.*, *The Role of Arachidonic and Linoleic Acid Derivatives in Pathological Pregnancies and the Human Reproduction Process*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
26. Hao, C.M. and M.D. Breyer, *Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney*. Kidney Int, 2007. **71**(11): p. 1105-15.
27. Salleh, N., *Diverse roles of prostaglandins in blastocyst implantation*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 968141.
28. Sonnweber, T., *et al.*, *Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).

29. Li, K., *et al.*, *Association of fatty acids and lipids metabolism in placenta with early spontaneous pregnancy loss in Chinese women*. Food Funct, 2018. **9**(2): p. 1179-1186.
30. Razdan, A., *et al.*, *Targeting the eicosanoid pathway in hepatocellular carcinoma*. American journal of cancer research, 2021. **11**: p. 2456-2476.
31. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale*. Biochimie, 2009. **91**(6): p. 791-5.
32. Burdet, J., *et al.*, *Inflammation, infection and preterm birth*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(29): p. 4741-8.
33. Eastman, A.J., *et al.*, *The Influence of Obesity and Associated Fatty Acids on Placental Inflammation*. Clin Ther, 2021. **43**(2): p. 265-278.
34. Huang, R., *et al.*, *Alterations of polyunsaturated fatty acid metabolism in ovarian tissues of polycystic ovary syndrome rats*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(7): p. 3388-3396.
35. Abdelwahab, S.A., *et al.*, *Localization of brain-type fatty acid-binding protein in Kupffer cells of mice and its transient decrease in response to lipopolysaccharide*. Histochem Cell Biol, 2003. **119**(6): p. 469-75.
36. Sykes, L., *et al.*, *Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour*. Reproduction, 2014. **148**(2): p. R29-40.
37. Mauro, A.K., *et al.*, *Fatty acids in normal and pathological pregnancies*. Mol Cell Endocrinol, 2022. **539**: p. 111466.
38. Hu, M., *et al.*, *Revisiting preeclampsia: a metabolic disorder of the placenta*. Febs j, 2022. **289**(2): p. 336-354.
39. Duttaroy, A.K. and S. Basak, *Maternal Fatty Acid Metabolism in Pregnancy and Its Consequences in the Feto-Placental Development*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 787848.
40. Tazzini, N. *Long Chain Fatty Acid Synthesis In Plants and Animals*. Tuscany Diet 2013; Available from: <https://www.tuscany-diet.net/2013/02/03/long-chain-fatty-acid-synthesis/>.
41. Hanebutt, F.L., *et al.*, *Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta*. Clin Nutr, 2008. **27**(5): p. 685-93.
42. Larqué, E., *et al.*, *In vivo investigation of the placental transfer of (13)C-labeled fatty acids in humans*. J Lipid Res, 2003. **44**(1): p. 49-55.
43. Desforges, M. and C.P. Sibley, *Placental nutrient supply and fetal growth*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 377-90.

44. Duttaroy, A.K., *Transport of fatty acids across the human placenta: a review*. Prog Lipid Res, 2009. **48**(1): p. 52-61.
45. Lewis, R.M., C.E. Childs, and P.C. Calder, *New perspectives on placental fatty acid transfer*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2018. **138**: p. 24-29.
46. Barman, M., *Long chain polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids - relation to genetic polymorphisms, diet and allergy development in children*. 2015.
47. Heftmann, E., *Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatographic and Electrophoretic Methods. Part A: Fundamentals and Techniques*. 2011: Elsevier Science.
48. Ismail, B. and S.S. Nielsen, *Basic Principles of Chromatography*, in *Food Analysis*. 2010, Springer US: Boston, MA. p. 473-498.
49. Coskun, O., *Separation techniques: Chromatography*. North Clin Istanb, 2016. **3**(2): p. 156-160.
50. Walter, G.J.C., F. Poole, *Gas Chromatography*, C.F. Poole, Editor. 2012, Elsevier. p. 1-17.
51. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. 2017: Cengage Learning.
52. William, W.C.J., Hutton. *What Column do I Need for Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids?* 2021; Available from: https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/what-column-do-i-need-for-gas-chromatographic-analysis-of-fatty-acids?gclid=Cj0KCQjwz6ShBhCMARIsAH9A0qXRg2Sx0fFYPL9TglPBRz5-1wquVXIC9cF-y9mjDiRzQfxbVrs5YuMaApQuEALw_wcB.
53. N.C., S.G., E. Napolitano,, *Gas chromatography of fatty acids*. Journal of Chromatography A, 1992. **624**(1-2): p. 37-51.
54. Karasek, F.W. and R.E. Clement, *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. 2012: Elsevier Science.
55. Kenkel, J., *Analytical Chemistry for Technicians*. 3rd ed. 2003, 2000 N.W. Corporate Blvd., Boca Raton, Florida 33431: CRC Press, LLC.
56. Poole, C., *Gas Chromatography*. 2012: Elsevier Science.
57. Hübschmann, H.J., *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications*. 2015: Wiley.

58. Brondz, I., *Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques*. *Analytica Chimica Acta*, 2002. **465**(1-2): p. 1-37.
59. Saini, R.K., *et al.*, *Advances in Lipid Extraction Methods-A Review*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(24).
60. Bielawska, K., I. Dziakowska, and W. Roszkowska-Jakimiec, *Chromatographic determination of fatty acids in biological material*. *Toxicol Mech Methods*, 2010. **20**(9): p. 526-37.
61. Eder, K., *Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1995. **671**(1-2): p. 113-131.
62. Duttaroy, A.K. and S. Basak, *Maternal dietary fatty acids and their roles in human placental development*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2020. **155**: p. 102080.
63. Ford, H.B. and D.J. Schust, *Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy*. *Rev Obstet Gynecol*, 2009. **2**(2): p. 76-83.
64. Kwak-Kim, J., K.M. Yang, and A. Gilman-Sachs, *Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation*. *J Obstet Gynaecol Res*, 2009. **35**(4): p. 609-22.
65. Godhamgaonkar, A.A., N.S. Wadhvani, and S.R. Joshi, *Exploring the role of LC-PUFA metabolism in pregnancy complications*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2020. **163**: p. 102203.
66. Toufaily, C., *et al.*, *MFSD2a, the Syncytin-2 receptor, is important for trophoblast fusion*. *Placenta*, 2013. **34**(1): p. 85-8.
67. Kulkarni, A.V., *et al.*, *Reduced placental docosahexaenoic acid levels associated with increased levels of sFlt-1 in preeclampsia*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011. **84**(1-2): p. 51-5.
68. Bakouei, F., *et al.*, *Efficacy of n-3 fatty acids supplementation on the prevention of pregnancy induced-hypertension or preeclampsia: A systematic review and meta-analysis*. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2020. **59**(1): p. 8-15.
69. Babin, F., *et al.*, *Nervonic acid in red blood cell sphingomyelin in premature infants: an index of myelin maturation?* *Lipids*, 1993. **28**(7): p. 627-30.

70. Moser, G. and B. Huppertz, *Implantation and extravillous trophoblast invasion: From rare archival specimens to modern biobanking*. Placenta, 2017. **56**: p. 19-26.
71. Mor, G. and I. Cardenas, *The immune system in pregnancy: a unique complexity*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 425-33.
72. Spencer, L., et al., *The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential*. Eur J Cancer, 2009. **45**(12): p. 2077-86.
73. Zhang, Y. and Y. Daaka, *PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cy pathway*. Blood, 2011. **118**(19): p. 5355-64.
74. Li, M., et al., *The Arachidonic Acid Metabolism Mechanism Based on UPLC-MS/MS Metabolomics in Recurrent Spontaneous Abortion Rats*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 652807.
75. Matsumoto, H., et al., *Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation*. Biol Reprod, 2001. **64**(5): p. 1557-65.
76. Bobiński, R., et al., *Placental expression of Fatty Acid Desaturases 1, 2 and 3 in selected pregnancy pathologies*. Acta Biochim Pol, 2023. **70**(1): p. 137-144.
77. Zarei, A., et al., *Effects of piroxicam administration on pregnancy outcome in intrauterine insemination (IUI) cycles: a randomized clinical trial*. Clin Exp Obstet Gynecol, 2016. **43**(2): p. 225-9.
78. Rum, P. and G. Hornstra, *The n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid composition of plasma phospholipids in pregnant women and their infants. relationship with maternal linoleic acid intake*. Clin Chem Lab Med, 2002. **40**(1): p. 32-9.
79. Tessier-Prigent, A., et al., *Arachidonic acid induces differentiation of uterine stromal to decidual cells*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**(6): p. 398-406.
80. Sassin, A.B., *Maternal fatty acid profiles in term and preterm pregnancies*, in *Department of Surgery and Cancer*. 2020, Imperial College London.
81. Dhobale, M.V., et al., *Reduced levels of placental long chain polyunsaturated fatty acids in preterm deliveries*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011. **85**(3-4): p. 149-53.
82. Malasevskaia, I., et al., *A 21st Century Epidemy-Obesity: And Its Impact on Pregnancy Loss*. Cureus, 2021. **13**(1): p. e12417.
83. Yang, X., et al., *Saturated fatty acids enhance TLR4 immune pathways in human trophoblasts*. Human Reproduction, 2015. **30**(9): p. 2152-2159.

84. Hong, Y.-j., *et al.*, *Unsaturated fatty acids protect trophoblast cells from saturated fatty acid-induced autophagy defects*. *Journal of Reproductive Immunology*, 2018. **125**: p. 56-63.
85. Liu, Y., *et al.*, *PKC δ promotes fertilization of mouse embryos in early development via the Cdc25B signaling pathway*. *Exp Ther Med*, 2019. **18**(5): p. 3281-3290.

5 Přílohy

Tabulka 5: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci PL

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	2,846	12,532	1,966	7,413	8,469	5,124	6,565	7,470
Palmitová k.	C16:0	121,784	123,923	116,312	139,585	114,869	94,256	92,393	88,633
Stearová k.	C18:0	59,363	55,417	58,918	54,109	47,057	51,229	49,773	37,508
Olejová k.	C18:1 n-9	85,845	75,588	53,917	81,301	66,823	56,200	53,744	48,859
Linolová k.	C18:2 n-6	31,099	35,503	28,451	36,019	30,753	29,630	35,580	35,828
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	2,627	1,818	2,533	0,820	1,419	2,252	2,166	1,010
α -linolenová k.	C18:3 n-3	3,525	6,203	1,587	4,334	1,200	0,800	0,820	0,663
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	9,194	6,983	7,478	5,672	3,481	3,680	5,536	3,515
Arachidonová k.	C20:4 n-6	16,986	13,829	14,796	19,563	15,209	19,649	14,850	18,215
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	8,951	8,141	5,655	8,686	8,914	9,456	9,136	6,069
Nervonová k.	C24:1 n-9	12,451	14,582	9,540	15,938	22,242	21,615	14,816	13,238
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	14,904	9,999	15,469	16,479	17,351	14,560	11,117	11,157
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,456	1,374	0,922	1,513	1,430	1,105	1,088	1,312
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	1,860	1,097	1,992	3,472	2,398	1,519	2,458	1,690
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	27,052	17,998	24,052	14,411	10,357	11,365	14,237	8,976

Tabulka 5: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci PL (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [µg/ml]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	5,028	2,703	1,473	4,914	9,093	3,974	4,392
Palmitová k.	C16:0	85,038	88,832	88,535	95,293	55,820	83,030	85,249
Stearová k.	C18:0	43,718	51,361	39,659	38,130	34,498	35,123	39,808
Olejová k.	C18:1 n-9	50,560	60,209	58,961	44,194	64,748	56,531	60,242
Linolová k.	C18:2 n-6	32,769	30,786	34,692	37,681	35,666	30,166	27,269
γ-linolenová k.	C18:3 n-6	1,014	1,940	1,064	1,318	2,024	1,216	2,083
α-linolenová k.	C18:3 n-3	2,162	1,104	0,597	1,069	3,771	2,029	1,908
Dihomo-γ-linolenová k.	C20:3 n-6	4,028	7,314	4,400	3,910	2,518	8,051	1,897
Arachidonová k.	C20:4 n-6	14,548	15,989	19,123	18,118	17,042	18,432	14,135
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	7,620	11,289	11,288	11,765	11,082	12,436	15,351
Nervonová k.	C24:1 n-9	15,169	17,571	25,519	14,384	15,234	20,767	13,394
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	9,628	12,851	15,747	9,925	13,232	9,676	10,085
Enzymy		Aktivita						
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	1,165	1,181	1,497	1,167	1,890	1,621	1,524
Δ5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	2,712	2,601	3,420	1,411	2,167	1,625	1,889
Δ6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	11,248	21,739	11,606	9,494	6,460	24,422	6,367

Tabulka 6: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci PL

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	6,721	8,286	5,291	7,079	7,893	5,870	4,580	8,458
Palmitová k.	C16:0	137,171	115,800	140,959	91,578	115,319	100,795	80,911	149,380
Stearová k.	C18:0	57,698	38,488	42,742	60,034	47,661	73,414	40,677	38,201
Olejová k.	C18:1 n-9	64,999	72,842	67,352	50,557	71,733	67,939	68,648	56,581
Linolová k.	C18:2 n-6	32,791	28,138	31,280	25,906	30,525	31,218	29,231	30,419
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	2,042	0,803	0,671	0,972	1,014	2,037	0,747	1,118
α -linolenová k.	C18:3 n-3	1,554	1,324	2,264	1,364	2,051	1,237	1,595	2,414
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	3,108	4,843	6,133	7,166	8,343	6,823	8,872	7,448
Arachidonová k.	C20:4 n-6	23,328	21,097	20,724	23,202	20,426	22,568	25,584	26,388
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	5,275	5,995	6,842	4,820	5,458	4,863	8,222	8,740
Nervonová k.	C24:1 n-9	9,142	6,988	11,854	13,684	10,999	9,742	6,789	7,161
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	5,342	7,195	6,999	6,837	4,793	5,609	6,874	5,557
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,135	1,906	1,587	0,848	1,516	0,932	1,700	1,492
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	2,860	2,860	3,301	3,401	4,191	3,329	5,622	5,335
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	8,672	15,750	17,942	25,312	25,010	20,000	27,773	22,404

Tabulka 6: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci PL (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	6,652	4,372	5,577	3,422	4,350	6,041	5,943
Palmitová k.	C16:0	91,493	76,998	87,546	83,512	100,131	93,021	126,399
Stearová k.	C18:0	44,025	52,059	41,160	55,060	48,500	46,133	57,984
Olejová k.	C18:1 n-9	60,295	52,337	59,111	62,498	72,794	57,009	61,052
Linolová k.	C18:2 n-6	26,892	28,822	22,200	30,120	30,863	22,286	27,462
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	3,822	1,990	2,689	1,827	4,061	3,915	3,532
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,103	1,267	1,914	1,920	2,154	2,086	0,745
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	7,303	6,110	8,160	7,181	7,385	7,045	7,742
Arachidonová k.	C20:4 n-6	26,887	15,078	13,081	18,858	20,964	20,084	19,788
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	6,563	5,627	6,326	7,989	8,980	6,771	8,624
Nervonová k.	C24:1 n-9	7,762	11,972	6,259	9,285	10,313	9,679	8,168
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	5,736	5,539	7,368	5,260	6,199	5,634	7,397
Enzymy		Aktivita						
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,379	1,013	1,446	1,143	1,512	1,245	1,060
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	4,742	2,484	1,780	2,643	3,714	2,870	4,957
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	24,849	19,398	33,634	21,817	21,895	28,926	25,798

Tabulka 7: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci DG

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	3,460	1,418	1,561	1,718	1,615	1,459	1,716	1,699
Palmitová k.	C16:0	41,782	15,284	18,476	18,356	21,451	12,551	17,686	15,140
Stearová k.	C18:0	17,118	13,286	16,879	13,990	18,998	11,729	13,810	9,386
Olejová k.	C18:1 n-9	13,495	13,863	12,729	14,940	14,258	14,797	16,705	12,061
Linolová k.	C18:2 n-6	6,577	2,594	2,665	3,482	3,975	2,093	2,912	2,651
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	1,357	0,561	0,441	0,520	1,113	0,470	0,587	0,748
α -linolenová k.	C18:3 n-3	3,106	1,557	1,453	0,997	0,827	0,111	1,132	0,168
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	1,263	0,140	0,369	0,184	0,268	0,277	0,518	0,520
Arachidonová k.	C20:4 n-6	3,805	5,209	2,401	3,627	3,269	3,153	2,044	2,291
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	3,871	1,172	2,416	2,473	1,546	1,457	1,072	1,448
Nervonová k.	C24:1 n-9	11,629	7,899	3,349	5,122	9,415	7,422	10,762	11,062
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	0,824	1,093	0,796	0,705	2,866	2,428	2,469	3,232
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	2,794	2,051	3,760	1,076	2,756	1,271	1,218	1,294
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	13,032	17,484	6,555	9,808	12,296	11,440	3,972	4,435
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	17,576	14,935	12,655	14,844	16,162	12,129	16,283	17,948

Tabulka 7: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci DG (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	1,419	1,712	2,114	1,839	2,351	1,806	1,950
Palmitová k.	C16:0	11,171	12,827	18,059	15,754	17,829	16,757	18,051
Stearová k.	C18:0	9,360	8,366	14,884	11,630	11,043	10,929	12,307
Olejová k.	C18:1 n-9	14,079	15,902	13,626	13,088	13,282	14,035	13,460
Linolová k.	C18:2 n-6	2,029	2,068	4,316	5,265	5,021	4,893	3,453
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	0,842	0,545	1,216	0,756	0,789	0,631	0,988
α -linolenová k.	C18:3 n-3	0,605	0,395	0,569	1,116	0,117	0,720	1,344
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	0,436	0,410	0,479	0,377	0,359	0,484	0,299
Arachidonová k.	C20:4 n-6	1,190	2,731	2,901	2,224	2,131	2,082	1,155
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	3,664	0,142	2,152	0,660	1,781	2,561	1,784
Nervonová k.	C24:1 n-9	6,376	8,394	8,647	11,732	10,531	9,079	12,994
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	2,127	3,282	2,845	2,275	2,803	2,140	2,710
Enzymy		Aktivita						
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,515	1,914	0,922	1,133	1,211	1,293	1,102
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	8,747	6,707	6,096	5,930	5,976	4,328	5,893
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	19,669	18,132	10,154	6,559	6,543	9,056	7,916

Tabulka 8: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci DG

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	0,898	2,312	1,186	1,665	0,929	1,070	1,802	0,984
Palmitová k.	C16:0	14,611	17,038	15,066	14,767	18,618	14,505	12,868	15,235
Stearová k.	C18:0	5,853	5,121	7,677	7,100	7,483	12,860	12,868	7,828
Olejová k.	C18:1 n-9	8,212	6,876	10,880	10,888	7,926	11,937	8,058	9,029
Linolová k.	C18:2 n-6	3,181	2,155	1,669	2,390	1,639	2,419	1,681	1,601
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	0,424	0,516	0,485	0,361	0,395	0,579	0,655	0,601
α -linolenová k.	C18:3 n-3	0,331	0,908	0,597	0,309	0,604	0,749	0,219	0,281
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	0,216	0,240	0,262	0,166	0,348	0,293	0,380	0,433
Arachidonová k.	C20:4 n-6	2,742	1,078	1,040	1,654	2,521	3,125	2,619	1,631
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	0,869	0,670	2,355	1,251	0,388	1,878	0,183	1,789
Nervonová k.	C24:1 n-9	2,592	2,628	2,903	2,483	4,358	3,241	2,827	2,296
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	2,351	0,999	1,007	0,962	1,081	1,249	1,252	0,555
Enzymy		Aktivita							
$\Delta 9$ -desaturáza	18:1/18:0	1,413	1,352	1,427	1,544	1,067	0,935	0,631	1,162
$\Delta 5$ -desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	9,060	10,755	3,993	10,053	2,693	7,902	4,667	3,794
$\Delta 6$ -desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	6,219	10,204	14,383	6,342	19,423	11,094	20,679	24,736

Tabulka 8: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci DG (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	1,117	2,262	0,734	1,538	0,698	1,975	1,313
Palmitová k.	C16:0	27,237	16,153	17,033	20,501	15,273	6,905	14,827
Stearová k.	C18:0	6,633	10,872	14,452	16,317	11,015	10,600	7,379
Olejová k.	C18:1 n-9	6,638	7,762	7,002	9,875	10,851	11,660	10,516
Linolová k.	C18:2 n-6	2,373	1,686	3,215	2,083	3,131	1,580	3,039
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	0,617	0,516	0,467	0,846	0,757	0,432	0,379
α -linolenová k.	C18:3 n-3	1,474	1,115	1,756	0,713	0,724	0,543	0,953
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	0,324	0,262	0,247	0,215	0,262	0,364	0,441
Arachidonová k.	C20:4 n-6	2,888	0,802	1,736	2,981	2,238	2,638	1,306
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	2,428	1,534	1,282	1,741	1,793	1,770	2,886
Nervonová k.	C24:1 n-9	4,698	3,654	3,328	4,265	7,765	2,640	3,331
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	2,524	0,934	0,883	1,053	1,109	0,956	1,010
Enzymy		Aktivita						
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,008	0,719	0,488	0,610	0,992	1,108	1,435
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	6,488	5,979	3,966	6,128	8,606	5,256	2,982
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	12,507	14,220	7,044	9,434	7,652	21,068	13,278

Tabulka 9: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci VMK

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	3,095	2,891	2,533	3,570	4,630	2,394	2,681	2,670
Palmitová k.	C16:0	44,858	40,646	41,674	57,339	61,367	29,882	34,339	30,027
Stearová k.	C18:0	24,347	19,798	21,986	24,964	37,386	17,008	17,291	13,172
Olejová k.	C18:1 n-9	39,359	38,514	35,841	55,233	48,805	22,997	23,590	22,716
Linolová k.	C18:2 n-6	13,877	13,337	12,651	18,576	17,117	9,502	9,715	8,797
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	3,198	1,623	2,837	2,999	1,795	1,109	0,889	2,105
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,247	3,752	2,338	4,029	1,749	1,666	1,076	3,448
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	1,114	1,542	2,473	1,832	2,429	1,548	1,493	1,365
Arachidonová k.	C20:4 n-6	3,270	4,314	3,518	3,484	4,202	3,050	3,018	2,576
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	2,723	4,343	3,375	1,563	2,750	2,715	2,207	3,816
Nervonová k.	C24:1 n-9	4,468	10,426	9,413	16,057	11,909	14,036	10,246	10,861
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	3,547	3,685	3,282	2,835	3,554	5,112	5,459	10,471
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,628	1,959	1,642	2,228	1,315	1,362	1,374	1,737
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	2,955	2,816	1,432	1,914	1,742	1,983	2,034	1,900
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	7,344	10,580	17,884	9,024	12,983	14,906	14,066	14,198

Tabulka 9: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci VMK (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	2,429	2,884	2,972	2,376	1,974	3,185	2,951
Palmitová k.	C16:0	23,511	29,390	20,906	44,085	24,647	44,606	32,234
Stearová k.	C18:0	9,292	12,576	15,729	16,332	25,783	15,335	15,669
Olejová k.	C18:1 n-9	17,642	22,010	52,341	49,441	27,330	44,902	49,509
Linolová k.	C18:2 n-6	6,660	8,449	16,681	15,182	10,269	13,950	15,571
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	2,065	2,246	1,508	3,203	1,853	0,996	2,132
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,489	0,775	1,119	3,718	0,927	1,103	2,496
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	1,237	1,152	1,387	1,823	1,629	1,547	1,274
Arachidonová k.	C20:4 n-6	2,778	5,639	5,333	2,721	3,766	2,973	4,067
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	6,473	4,487	2,897	4,300	6,854	2,929	8,717
Nervonová k.	C24:1 n-9	8,035	13,658	8,647	13,514	9,857	9,796	7,410
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	7,373	9,497	6,766	8,366	6,972	4,194	11,916
Enzymy		Aktivita						
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,912	1,763	3,351	3,049	1,068	2,949	3,182
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	8,260	4,928	3,872	9,502	2,326	8,934	8,214
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	17,000	12,474	7,606	10,990	14,519	10,148	7,486

Tabulka 10: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci VMK

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	1,322	3,614	4,404	1,711	2,225	2,915	2,224	1,580
Palmitová k.	C16:0	54,268	51,664	50,553	33,133	46,691	35,714	49,646	40,155
Stearová k.	C18:0	18,384	15,641	13,142	19,240	14,548	19,438	14,734	10,239
Olejová k.	C18:1 n-9	39,694	24,041	29,965	33,274	28,835	15,577	16,853	35,041
Linolová k.	C18:2 n-6	12,104	9,526	6,774	10,689	9,892	17,293	10,981	10,425
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	2,058	1,857	1,284	0,726	1,067	1,121	2,222	1,455
α -linolenová k.	C18:3 n-3	1,131	2,135	1,272	0,637	1,270	0,779	1,374	2,191
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	0,694	0,144	0,339	1,436	0,612	0,760	1,525	0,487
Arachidonová k.	C20:4 n-6	5,448	5,851	8,548	5,608	7,498	5,534	3,874	3,217
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	3,059	0,637	1,078	1,085	2,614	2,241	0,561	3,286
Nervonová k.	C24:1 n-9	3,300	3,816	3,912	3,758	3,040	3,587	2,440	2,574
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	2,632	0,991	2,629	1,386	2,047	2,678	1,771	1,769
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	2,175	1,548	2,296	1,742	1,996	0,807	1,152	3,447
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	7,907	41,028	25,409	3,931	12,338	7,325	2,556	6,656
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	15,323	3,046	5,206	28,849	9,463	4,024	12,711	4,271

Tabulka 10: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci VMK (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [µg/ml]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	1,673	3,806	2,475	5,368	4,835	4,653	4,098
Palmitová k.	C16:0	33,692	43,648	32,344	34,885	48,727	31,552	30,990
Stearová k.	C18:0	13,488	18,389	21,454	19,033	16,334	22,712	20,112
Olejová k.	C18:1 n-9	38,607	26,780	29,747	23,333	27,674	13,347	28,226
Linolová k.	C18:2 n-6	14,548	12,565	13,300	17,524	14,201	8,485	12,978
γ-linolenová k.	C18:3 n-6	1,999	1,117	1,157	1,701	0,715	1,693	1,052
α-linolenová k.	C18:3 n-3	2,994	1,015	1,121	1,152	3,049	1,123	0,555
Dihomo-γ-linolenová k.	C20:3 n-6	1,025	2,013	1,484	3,095	2,019	2,888	0,661
Arachidonová k.	C20:4 n-6	4,309	4,798	5,971	4,179	5,588	6,535	5,814
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	3,519	2,500	1,044	1,060	3,049	2,692	2,305
Nervonová k.	C24:1 n-9	3,318	6,475	3,647	3,406	3,366	2,717	3,786
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	1,215	2,126	2,369	3,387	0,940	2,171	1,157
Enzymy		Aktivita						
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	2,883	1,467	1,396	1,235	1,706	0,592	1,413
Δ5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	4,231	2,400	4,051	1,359	2,786	2,278	8,851
Δ6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	6,448	14,656	10,208	16,159	13,010	31,141	4,662

Tabulka 11: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci TG

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	8,367	4,911	7,316	4,776	9,551	10,060	7,536	8,114
Palmitová k.	C16:0	181,889	192,367	168,170	168,503	166,416	153,323	112,345	113,707
Stearová k.	C18:0	36,008	40,843	36,684	31,259	30,299	38,368	37,651	26,330
Olejová k.	C18:1 n-9	91,267	81,340	64,438	74,024	73,043	54,573	44,051	36,876
Linolová k.	C18:2 n-6	60,110	56,084	57,060	73,118	57,280	49,618	44,603	36,836
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	2,678	3,405	2,934	5,699	4,839	6,103	3,823	4,703
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,333	1,048	2,484	3,015	4,774	3,072	3,778	2,618
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	2,780	2,943	2,630	3,201	3,775	3,485	3,169	2,998
Arachidonová k.	C20:4 n-6	7,370	7,954	6,056	9,940	9,655	5,987	5,464	4,874
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	4,930	2,918	2,641	4,507	1,404	4,059	0,994	1,225
Nervonová k.	C24:1 n-9	6,159	2,861	4,330	3,446	4,811	8,731	5,998	6,146
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	2,281	7,785	2,345	5,454	3,414	4,096	4,161	4,019
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	2,553	2,006	1,769	2,385	2,428	1,433	1,178	1,411
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	2,668	2,720	2,318	3,125	2,574	1,730	1,736	1,637
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	4,233	3,183	4,217	5,831	4,831	6,031	4,584	6,447

Tabulka 11: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci TG (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	6,724	8,421	7,947	7,229	8,120	7,828	8,053
Palmitová k.	C16:0	88,786	112,406	84,182	132,146	153,817	135,854	200,440
Stearová k.	C18:0	33,392	41,996	32,322	37,262	32,069	37,655	40,427
Olejová k.	C18:1 n-9	47,806	67,502	26,095	49,180	34,681	40,577	64,318
Linolová k.	C18:2 n-6	40,878	43,774	37,988	35,866	28,676	61,603	48,483
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	1,130	1,041	2,225	1,253	1,099	1,135	2,008
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,417	4,609	4,579	2,339	4,157	3,847	6,654
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	3,269	2,978	3,012	2,453	2,276	2,816	3,021
Arachidonová k.	C20:4 n-6	6,280	5,323	5,398	4,275	3,891	5,490	6,332
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	1,782	3,987	5,337	1,759	5,034	3,676	4,236
Nervonová k.	C24:1 n-9	10,377	5,478	9,133	7,932	10,229	9,521	10,903
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	7,194	5,057	6,260	6,132	7,710	5,483	6,775
Enzymy		Aktivita						
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,442	1,619	0,813	1,329	2,089	2,809	3,602
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	1,934	1,799	1,804	1,754	1,721	1,963	2,110
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	6,317	5,192	3,458	6,979	5,012	4,427	5,033

Tabulka 12: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci TG

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	7,252	7,758	6,909	7,626	8,702	6,942	12,826	14,324
Palmitová k.	C16:0	205,039	189,133	161,206	162,024	152,568	133,248	182,521	160,461
Stearová k.	C18:0	30,518	48,226	40,632	44,354	61,053	32,848	34,636	21,512
Olejová k.	C18:1 n-9	65,449	64,453	65,802	47,541	68,825	77,056	46,242	77,012
Linolová k.	C18:2 n-6	36,026	36,415	48,455	29,886	39,609	29,842	43,053	36,707
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	5,530	3,697	3,545	3,159	2,553	3,881	3,533	4,218
α -linolenová k.	C18:3 n-3	0,985	4,966	1,753	3,651	3,119	2,368	5,109	3,840
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	3,699	2,009	3,729	3,571	3,014	1,956	4,911	2,048
Arachidonová k.	C20:4 n-6	8,038	5,872	9,822	9,795	7,145	8,086	10,158	7,841
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	0,767	1,909	3,199	1,930	2,397	0,382	2,942	1,447
Nervonová k.	C24:1 n-9	3,371	3,099	2,351	3,150	4,177	3,860	1,930	2,795
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	1,157	2,455	3,314	0,913	0,894	1,773	1,543	1,300
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	2,160	1,346	1,631	1,080	1,135	2,363	1,345	3,606
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	2,188	2,942	2,651	2,761	2,386	4,161	2,082	3,855
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	4,676	3,306	3,712	5,544	5,815	5,999	5,227	5,104

Tabulka 12: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci TG (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	8,429	6,281	7,083	12,537	8,311	8,059	7,922
Palmitová k.	C16:0	164,326	142,856	113,637	183,265	153,338	142,986	154,942
Stearová k.	C18:0	41,724	41,529	46,185	51,605	43,834	34,835	50,568
Olejová k.	C18:1 n-9	58,983	59,624	69,843	74,585	81,104	60,185	62,056
Linolová k.	C18:2 n-6	43,071	44,931	37,622	56,089	42,879	50,656	42,534
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	4,033	2,382	3,735	4,064	3,555	2,061	1,799
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,196	2,931	2,638	3,727	2,848	1,306	3,520
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	3,492	2,096	2,818	3,272	4,067	3,380	2,662
Arachidonová k.	C20:4 n-6	10,249	4,543	5,682	5,296	6,183	10,173	7,863
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	3,140	1,841	1,925	2,449	3,347	3,365	2,288
Nervonová k.	C24:1 n-9	2,518	3,377	4,807	4,418	2,335	2,078	3,113
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	1,510	1,874	1,843	2,792	2,556	2,390	3,442
Enzymy		Aktivita						
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	1,424	1,446	1,523	1,456	1,863	1,740	1,236
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	2,954	2,182	2,030	1,629	1,530	3,030	2,974
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	4,946	4,195	3,152	4,720	4,027	3,081	3,415

Tabulka 13: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci ECH

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	5,267	4,911	5,090	4,776	5,663	7,119	4,985	4,050
Palmitová k.	C16:0	45,197	42,590	48,166	47,069	51,309	45,096	51,335	40,417
Stearová k.	C18:0	15,676	18,019	13,115	17,597	17,722	20,169	10,835	16,979
Olejová k.	C18:1 n-9	52,074	65,649	57,180	68,000	58,983	62,030	51,211	64,251
Linolová k.	C18:2 n-6	66,914	78,908	86,605	73,118	53,724	35,217	48,576	40,617
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	1,400	1,482	2,542	5,780	1,351	1,076	1,092	0,276
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,189	1,048	2,711	3,015	1,751	4,724	2,074	3,904
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	1,702	2,975	1,458	2,742	2,461	1,595	1,444	1,246
Arachidonová k.	C20:4 n-6	9,756	7,563	7,967	6,854	9,163	5,105	2,451	2,686
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	4,961	3,845	6,449	6,981	3,134	7,185	3,246	7,050
Nervonová k.	C24:1 n-9	8,531	7,724	6,337	8,929	13,663	10,049	8,927	11,078
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	10,674	7,550	7,141	8,976	10,039	6,096	7,315	10,300
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	3,346	3,669	4,391	3,892	3,352	3,098	4,760	3,811
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	5,768	2,559	5,499	2,517	3,748	3,222	1,708	2,171
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	2,328	3,450	1,541	3,431	4,191	4,144	2,721	2,806

Tabulka 13: Koncentrace MK ve fyziologických vzorcích ve frakci ECH (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [µg/ml]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	3,936	4,643	2,811	2,363	2,416	2,402	2,665
Palmitová k.	C16:0	26,795	31,609	39,745	40,787	38,969	33,687	44,678
Stearová k.	C18:0	12,023	15,158	11,641	12,656	14,645	11,437	12,811
Olejová k.	C18:1 n-9	48,109	62,157	46,261	42,299	43,100	51,695	44,070
Linolová k.	C18:2 n-6	34,317	57,208	43,575	56,978	65,561	35,114	54,672
γ-linolenová k.	C18:3 n-6	4,432	1,525	3,637	1,207	6,589	3,656	0,883
α-linolenová k.	C18:3 n-3	2,499	2,155	3,732	5,552	3,751	1,141	6,776
Dihomo-γ-linolenová k.	C20:3 n-6	1,211	1,618	1,344	1,684	1,275	1,261	1,943
Arachidonová k.	C20:4 n-6	2,231	3,375	4,069	2,718	2,872	2,462	4,496
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	8,439	3,139	8,519	3,201	8,136	7,377	4,352
Nervonová k.	C24:1 n-9	6,715	13,625	12,337	8,916	12,751	13,542	11,915
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	6,466	8,594	9,049	9,974	7,754	6,778	6,616
Enzymy		Aktivita						
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	4,030	4,130	4,003	3,366	2,964	4,552	3,465
Δ5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	1,855	2,099	3,047	1,624	2,268	1,965	2,329
Δ6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	3,228	2,589	2,823	2,705	1,779	3,287	3,252

Tabulka 14: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci ECH

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Myristová k.	C14:0	4,009	2,057	5,456	2,358	1,906	5,578	3,907	5,772
Palmitová k.	C16:0	33,219	41,082	29,107	44,993	27,961	56,012	66,834	51,617
Stearová k.	C18:0	10,105	9,674	5,775	7,257	13,140	7,545	15,305	8,917
Olejová k.	C18:1 n-9	33,432	44,769	36,932	28,327	44,675	52,023	37,045	63,310
Linolová k.	C18:2 n-6	49,128	46,646	37,465	51,833	60,413	31,013	47,940	57,240
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	0,322	0,716	2,329	0,715	1,719	1,037	3,095	3,548
α -linolenová k.	C18:3 n-3	2,937	3,222	2,125	1,180	2,751	1,034	1,713	3,247
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	1,528	2,142	0,576	0,647	2,007	0,662	2,523	2,389
Arachidonová k.	C20:4 n-6	6,844	5,818	8,923	8,966	7,009	6,559	7,959	9,498
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	6,192	1,495	5,706	0,568	4,038	5,385	7,098	4,577
Nervonová k.	C24:1 n-9	5,272	4,129	7,340	4,563	5,157	4,050	5,844	7,557
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	4,448	5,082	3,447	5,228	5,372	4,281	4,491	3,153
Enzymy		Aktivita							
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	3,332	4,661	6,441	3,932	3,424	6,945	2,438	7,151
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	4,510	2,734	15,602	13,956	3,516	9,973	3,176	4,002
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	2,652	1,280	1,406	1,142	1,041	1,953	1,540	1,188

Tabulka 14: Koncentrace MK v patologických vzorcích ve frakci ECH (pokračování)

Mastná kyselina	Vzorec	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]						
		9	10	11	12	13	14	15
Myristová k.	C14:0	6,553	4,130	5,310	2,235	1,427	2,025	2,281
Palmitová k.	C16:0	46,285	51,760	26,516	27,989	22,610	39,245	31,824
Stearová k.	C18:0	7,105	6,877	8,704	12,516	6,919	7,134	7,877
Olejová k.	C18:1 n-9	49,690	31,233	43,397	65,402	70,794	56,118	70,977
Linolová k.	C18:2 n-6	68,610	27,289	19,495	47,632	62,545	51,401	36,040
γ -linolenová k.	C18:3 n-6	1,766	3,527	2,301	2,213	3,610	2,033	1,010
α -linolenová k.	C18:3 n-3	3,962	1,355	1,156	2,324	1,456	2,107	2,806
Dihomo- γ -linolenová k.	C20:3 n-6	1,198	1,381	2,032	1,122	2,029	2,115	2,052
Arachidonová k.	C20:4 n-6	6,126	7,114	6,219	5,257	3,975	3,675	6,084
Eikosapentaenová k.	C20:5 n-3	5,272	4,791	3,676	4,462	2,013	3,762	3,855
Nervonová k.	C24:1 n-9	3,686	4,761	6,751	4,258	5,261	6,502	7,071
Dokosahexaenová k.	C22:6 n-3	3,215	3,668	2,537	2,831	4,906	2,885	2,880
Enzymy		Aktivita						
Δ 9-desaturáza	18:1/18:0	7,043	4,574	5,022	5,263	10,305	7,923	9,075
Δ 5-desaturáza	20:4n-6/20:3n-6	5,145	5,186	3,082	4,716	1,972	1,749	2,985
Δ 6-desaturáza x 100	20:3n-6/18:2n-6	1,276	2,100	2,394	0,548	0,551	1,996	1,427