

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Studium vlivu plazmatických mastných kyselin na progresi diabetu typu 2

Bc. Pavla Fialová

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla Fialová**
Osobní číslo: **C16444**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Studium vlivu plazmatických mastných kyselin na progresi diabetu typu 2**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

- 1) Vypracujte literární rešerši se zaměřením na lipidový metabolismus diabetiků typu 2.
- 2) Popište metodiku stanovení významných lipidů a mastných kyselin pro diagnostiku diabetu typu 2 se zaměřením na tenkovrstevnou a plynovou chromatografii.

Experimentální část:

- 1) U diabetiků se středním a těžkým postižením a u kontrolní skupiny proveďte rozdělení EDTA plazmy do pěti tříd (fosfolipidy, diacylglyceroly, mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu) pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě.
- 2) Stanovte obsah mastných kyselin ve všech třídách lipidů pomocí plynové chromatografie.
- 3) Vypočtete koncentrace mastných kyselin ve všech třídách lipidů u diabetiků a kontrolní skupiny a vypracujte jejich závislosti na koncentraci glykovaného hemoglobinu.
- 4) Proveďte statistické vyhodnocení výsledků, přehledně je prezentujte pomocí grafů a obrázků a diskutujte jejich použitelnost pro diagnostické účely.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

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

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

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předloženou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím citovaných zdrojů. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s právy a povinnostmi vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3. 5. 2018

.....

Pavla Fialová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Alexanderovi Čeganovi, CSc. za čas, odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při konzultacích a vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Radimu Janečkovi za pomoc, rady a vedení v laboratoři.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na studium metabolismu lipidů u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Teoretická část se nejprve věnuje popisu inzulínové rezistence. Druhá část se zabývá onemocněním diabetes mellitus. Třetí část je zaměřena na lipidy, jejich klasifikaci, charakterizaci a transport v krevním oběhu. V závěru teoretické části je stručně popsán princip použité metody analýzy mastných kyselin. Cílem diplomové práce je stanovit množství mastných kyselin v plazmě diabetiků 2. typu a zdravých dárců a zjištění vlivu léčby metforminem na lipidové spektrum.

KLÍČOVÁ SLOVA

inzulínová rezistence, diabetes mellitus 2. typu, lipidy, mastné kyseliny

TITLE

Study of the influence of plasma fatty acids on the progression of type 2 diabetes

ANNOTATION

This thesis is focused on the study of lipid metabolism in patients with diabetes mellitus type 2. The theoretical part at first deals with the description of insulin resistance. The second part deals with diabetes mellitus. The third part focuses on lipids, their classification, characterization and transport in the circulation of the blood. At the end of the theoretical part is briefly described the principle of the used method of analysis of fatty acids. The target of this thesis is to determine the amount of fatty acids in the plasma of type 2 diabetics and healthy donors and to determine the effect of treatment with metformin on the lipid spectrum.

KEYWORD

Insulin resistance, diabetes mellitus type 2, lipids, fatty acids

OBSAH

ÚVOD	14
1 CÍL PRÁCE	15
2 INZULÍNOVÁ REZISTENCE	16
2.1 Vznik inzulinové rezistence	16
2.1.1 Obezita	17
2.1.2 Adipokiny	18
2.1.3 Zánět	20
2.2 Projevy inzulinové rezistence	21
2.2.1 Tuková tkáň	21
2.2.2 Svalová tkáň.....	22
2.2.3 Játra.....	23
2.2.4 Endotel a cévy.....	24
2.2.5 β -buňky	25
2.3 Diagnostika	26
2.4 Léčba	26
3 DIABETES MELLITUS	28
3.1 Diabetes mellitus 2. typu.....	29
4 LIPIDY	31
4.1 Fyziologicky významné lipidy.....	31
4.1.1 Fosfolipidy	31
4.1.2 Triacylglyceroly.....	32
4.1.3 Mastné kyseliny	33
4.1.4 Cholesterol	35
4.2 Transport lipidů.....	36
4.2.1 Chylomikrony	38
4.2.2 Metabolismus VLDL	39

4.2.3	Metabolismus HDL.....	41
5	ANALÝZA MASTNÝCH KYSELIN	42
5.1	Extrakce lipidů	42
5.2	Tenkvrstvá chromatografie	42
5.3	Derivatizace.....	44
5.4	Plynová chromatografie	44
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
6.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	46
6.2	Chemikálie	47
6.3	Postup práce	49
6.3.1	Analyzované vzorky	49
6.3.2	Denaturace bílkovin a extrakce lipidů	49
6.3.3	Tenkvrstvá chromatografie	50
6.3.4	Derivatizace mastných kyselin	51
6.3.5	Plynová chromatografie	51
6.3.6	Vyhodnocení výsledků	52
7	VÝSLEDKY.....	53
7.1	Soubor pacientů.....	53
7.2	Vyhodnocení dat	55
7.3	Zastoupení mastných kyselin	55
7.4	Glykovaný hemoglobin.....	56
7.5	Léčba metforminem	63
8	DISKUZE.....	65
9	ZÁVĚR.....	69
10	POUŽITÁ LITERATURA.....	70
11	ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK	77
12	PŘÍLOHY.....	79

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A ZKRATEK

Seznam obrázků

Obrázek 1 Vznik IR působením infiltrovaných makrofágů M1.....	21
Obrázek 2 Schéma vzniku inzulínové rezistence vyvolané akumulací lipidů.	24
Obrázek 3 Vliv IR na vznik aterosklerózy..	25
Obrázek 4 Struktura fosfolipidu..	32
Obrázek 5 Struktura cholesterolu a cholesteryl esteru.	35
Obrázek 6 Struktura lipoproteinové částice s vysokou hustotou.	36
Obrázek 7 Metabolismus chylomikronu..	38
Obrázek 8 Metabolismus VLDL..	40
Obrázek 9 Tenkovrstvá chromatografie..	43
Obrázek 10 Schéma plynového chromatografu.	45

Seznam tabulek

Tabulka 1 Vrozené příčiny inzulínové rezistence.	17
Tabulka 2 Adipokiny ovlivňující citlivost k inzulínu.....	18
Tabulka 3 Rozdělení diabetes mellitus dle etiologie.....	28
Tabulka 4 Přehled antidiabetik a jejich vlastností	30
Tabulka 5 Rozdělení apolipoproteinů..	37
Tabulka 6 Rozdělení lipoproteinů.	37
Tabulka 7 Biochemické parametry vzorků diabetiků.....	53
Tabulka 8 Biochemické parametry vzorků zdravých dárců	79
Tabulka 9 Parametry přesnosti metody	80
Tabulka 10 Aktivita enzymů (medián) u zdravých dárců v jednotlivých frakcích	81
Tabulka 11 Aktivita enzymů (medián) u diabetiků v jednotlivých frakcích.....	81
Tabulka 12 Porovnání aktivit enzymů mezi diabetiky a zdravými dárci pomocí T-testu.....	81
Tabulka 13 Zastoupení MK ve frakci PL u diabetiků a zdravých dárců.....	82
Tabulka 14 Zastoupení MK ve frakci DG u diabetiků a zdravých dárců.....	83
Tabulka 15 Zastoupení MK ve frakci FFA u diabetiků a zdravých dárců	84
Tabulka 16 Zastoupení MK ve frakci TG u diabetiků a zdravých dárců	85
Tabulka 17 Zastoupení MK ve frakci EC u diabetiků a zdravých dárců	86

Seznam grafů

Graf 1 Koncentrace biochemických parametrů u jednotlivých skupin.....	54
Graf 2 Zastoupení vybraných mastných kyselin v plazmě u jednotlivých skupin pacientů....	55
Graf 3 Zastoupení vybraných mastných kyselin v plazmě u jednotlivých skupin pacientů....	56
Graf 4 Závislost kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků.	57
Graf 5 Závislost kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců.....	57
Graf 6 Závislost kyseliny nervonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků	58
Graf 7 Závislost kyseliny nervonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců.....	58
Graf 8 Závislost kyseliny arachové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků...	59
Graf 9 Závislost kyseliny arachové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců.....	59
Graf 10 Závislost kyseliny arachidonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků.....	60
Graf 11 Závislost kyseliny arachidonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců.....	60
Graf 12 Závislost kyseliny eikosapentaenové na glykovaném hemoglobinu ve frakci FFA u diabetiků.....	61
Graf 13 Závislost kyseliny eikosapentaenové na glykovaném hemoglobinu ve frakci FFA u zdravých dárců.....	61
Graf 14 Aktivitní indexy enzymů v plazmě.....	62
Graf 15 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci TG.....	63
Graf 16 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci TG.....	63
Graf 17 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci EC.....	64
Graf 18 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci EC.....	64

Seznam zkratek

AGE	produkty pokročilé glykace, advanced glycation end-products
Apo	apolipoproteiny
ATP	adenosintrifosfát, adenosine triphosphate
CETP	cholesterylester transfer protein
CRP	C-reaktivní protein
DG	diacylglyceroly
DM2T	diabetes mellitus 2. typu
EC	estery cholesterolu
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FA	masné kyseliny, fatty acids
FFA	volné masné kyseliny, free fatty acids
FAME	methylestery mastných kyselin, fatty acid methyl esters
GC	plynová chromatografie, gas chromatography
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou, high density lipoproteins
HL	jaterní lipáza, hepatic lipase
IKK	inhibitor NF- κ B kinázy, inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IR	inzulínová rezistence
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LCAT	lecithin:cholesterolacyltransferáza
LC-CoA	acyl-koenzym A s dlouhým řetězcem, long chain acyl-coenzym A
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou, low density lipoproteins
LRP receptor	LDL-related receptor protein
IDL	lipoproteiny se střední hustotou, intermediate density lipoproteins

IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
LPL	lipoproteinová lipáza
MCP-1	monocytární chemoatraktantní protein 1, monocyte chemoattractant protein 1
NO	oxid dusnatý, nitric oxide
OGTT	orální glukózový toleranční test
PAI-1	inhibitor plazminogenového aktivátoru 1, plasminogen activator inhibitor 1
PKC	proteinkináza C
PPAR- γ	receptory aktivované peoxisomovým proliferátorem gama, peroxisome proliferator-activated receptor gamma
ROS	reaktivní formy kyslíku, reactive oxygen species
SFA	nasycené mastné kyseliny, saturated fatty acids
SR-A	scavenger receptor type A
TLC	tenkovrstvá chromatografie, thin-layer chromatography
TG, TAG	triacylglyceroly
TNF α	tumor nekrotizující faktor α , tumor necrosis factor α
TZD	thiazolidindiony
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou, very low density lipoproteins

ÚVOD

Diabetes mellitus je jedním z nejčastějších chronických onemocnění. Nejvíce pacientů trpí diabetem 2. typu, pro který je charakteristické nedostatečné množství a účinek inzulínu v organismu. Jedná se o onemocnění převážně středního a vyššího věku, ale v současné době počet diabetiků celosvětově roste i u dětí a mladistvých. Nárůst tohoto onemocnění je především způsoben změnou životního stylu, kdy se zvyšuje konzumace sladkých a tučných potravin a snižuje pohybová aktivita.

Diabetu 2. typu předchází inzulínová rezistence (IR), kdy normální sekrece inzulínu vyvolá sníženou metabolickou odpověď. Vznik IR je spojen s obezitou a zánětlivou reakcí, kterou obezita vyvolává. Porušení metabolických procesů při IR se neomezuje pouze na metabolismus glukózy, ale je komplexní. Abnormality v lipidovém metabolismu se vyskytují řadu let před tím, než se diabetes klinicky manifestuje. Hyperglykémie, dyslipidémie a hypertenze, které jsou při diabetu přítomné, zvyšují riziko kardiovaskulárních chorob.

Diabetes je nejen problémem zdravotním, ale i ekonomických. V současné době je lékem první volby u pacientů s diabetem 2. typu metformin. Mechanismus jeho působení a jeho účinky nejsou dodnes přesně objasněny. Tato diplomová práce se zabývá složením mastných kyselin v plazmě diabetiků a působením metforminu na lipidový profil.

1 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je stanovit množství vybraných mastných kyselin v jednotlivých lipidových frakcích v EDTA plazmě pacientů s diabetes mellitus 2. typu (DM2T) a zdravých dárců pomocí tenkovrstvé a plynové chromatografie. Získaná data se následně statisticky zpracují a vyhodnotí ve vztahu ke koncentraci glykovaného hemoglobinu a dalším dostupným biochemickým parametrům. Cílem práce je rovněž charakterizovat výsledky léčby diabetu 2. typu metforminem a popsat její vliv na metabolismus mastných kyselin. Zjištěné závislosti je nutné posoudit také z hlediska použitelnosti pro diagnostické účely.

2 INZULÍNOVÁ REZISTENCE

Inzulín je peptidový hormon, který je vylučován β -buňkami pankreatu. Má zásadní roli při udržování energetické homeostázy, protože koordinuje skladování a využití živin v tukové tkáni, játrech a kosterním svalu. Jedná se o anabolický hormon, který jako jediný vyvolává snížení hladiny glukózy v krvi. Účinky inzulínu jsou ale rozmanité. Reguluje metabolismus sacharidů, lipidů a proteinů, má vazodilatační účinky, podporuje růst a dělení buněk, stimuluje transport iontů přes membránu a zabraňuje apoptóze [1, 2, 3].

IR je stav, při kterém je fyziologická koncentrace inzulínu v krevním oběhu nedostatečná k vyvolání adekvátní biologické odpovědi organismu. Snížením citlivosti k inzulínu vzniká hyperglykémie, protože v játrech není potlačena glukoneogeneze a vychytávání glukózy z oběhu je sníženo. Pankreatické β -buňky reagují na hyperglykémii zvýšenou sekrecí inzulínu. Vyšší hladiny inzulínu kompenzují jeho snížený účinek. Pokud už β -buňky nejsou schopny vylučovat dostatečné množství inzulínu, zvyšuje se hladina glukózy v krvi a vzniká onemocnění DM2T [2].

IR má značný klinický význam, protože je spojena s řadou závažných zdravotních problémů jako jsou: abnormality v krevním srážení a fibrinolýze, DM2T, hypertenze, aterogenní dyslipidémie nebo jaterní steatóza. Některé z těchto poruch se souhrnně označují jako metabolický syndrom [4].

2.1 Vznik inzulínové rezistence

Snížená citlivost k inzulínu může být vyvolána řadou příčin, které mohou být vrozené nebo získané. Vrozené defekty nejsou tak časté. Podle místa poškození inzulínové signalizace se vrozené formy IR dělí na pre-receptorové, receptorové a post-receptorové. Konkrétní příčiny defektů v daných oblastech jsou uvedeny v Tabulce 1 na straně 17 [5].

Z klinického hlediska jsou mnohem důležitější získané formy IR. Nejčastější příčinou získané IR je obezita související se změnou životního stylu (nedostatek fyzické aktivity, stres, kouření, nevhodné složení stravy a přejídání). I když existuje mnoho potenciálních molekulárních příčin IR, všechny jsou přímo nebo nepřímo vyvolány zvýšenou zánětlivou reakcí [1, 5].

Tabulka 1 Vrozené příčiny inzulínové rezistence. Převzato a upraveno z [1].

Pre-receptorové	protilátky proti inzulínu
	netytický inzulín
	zrychlené odbourání inzulínu
Receptorové	snížené množství inzulínových receptorů
	snížená vazba inzulínu na receptor
	protilátky blokující receptor
	mutace genů pro inzulínový receptor
Post-receptorové	mutace glukózových transportérů
	různé defekty v přenosu signálu

2.1.1 Obezita

Výskyt obezity v posledních letech rapidně vzrůstá. Ve většině vyspělých zemích je obézních více než 20 % obyvatel. Alarmující je stoupající počet obézních dětí a dospívajících. Základem epidemie obezity je změna životního stylu zahrnující nedostatek pohybu a nadměrnou konzumaci potravin bohatých na tuky a cukry [6].

Obezita je definována jako nadbytečné množství tukové tkáně v těle. Tuková tkáň je místem pro uložení přebytečné energie ve formě triacylglycerolů (TG). I když mohou adipocyty zvětšit svůj přirozený objem až třikrát, dlouhodobý nadměrný příjem potravy vede ke zvýšení jejich počtu. Při obezitě dochází ke zvýšení velikosti i počtu tukových buněk. Pokud tuková tkáň už nemůže pojmout přebytečné množství lipidů, dochází k jejich ukládání do jiných tkání jako jsou svaly, játra nebo pankreas. Ektopické ukládání lipidů přímo souvisí se vznikem a rozvojem IR, protože spouští zánětlivé reakce v daných tkáních. Změna v lipidovém metabolismu je hlavním mechanismem vzniku IR [6].

Důležité je rozložení tukové tkáně. Přebytek viscerálního tuku má negativní účinek na metabolismus glukózy a bílkovin. Obézní pacienti s převahou viscerální tukové tkáně jsou více rezistentní k inzulínu než pacienti s uložením tuku v periférii. Viscerální obezita je spojena s nižším vychytáváním a oxidací glukózy, zatímco oxidace lipidů je významně vyšší [7].

Nejčastější příčinou IR je obezita. Není zcela jasné, jak přesně obezita IR vyvolává. Předpokládá se, že IR vzniká působením řady mechanismů (mitochondriální dysfunkce, působením stresu na endoplazmatické retikulum, oxidační stres, změny v lipidovém metabolismu, hypoxie a další). Většina mechanismů je spojena s ektopickým uložením lipidů

a zánětem indukovaným obezitou. Příčinou ektopického ukládání tuku je zvýšená koncentrace volným mastných kyselin (FFA) v plazmě. Akumulace lipidů (TG) a jejich metabolitů (diacylglyceroly (DG), ceramidy, acylkoenzymy A s dlouhým řetězcem (LC-CoA)) uvnitř buňky narušuje přenos inzulínového signálu několika způsoby (aktivace serin/threoninových kináz, působením stresu na endoplazmatické retikulum). Vysoké hladiny FFA mohou vyvolat IR aktivací zánětlivých drah v buňce. Zvýšená sekrece prozánětlivých cytokinů (TNF α (tumor necrosis factor α), IL-1 (interleukin 1), IL-6 (interleukin 6)) a nárůst MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) má za následek přísun makrofágů do místa zánětu [1, 4, 8].

V dnešní době představuje obezita společně s IR běžné zdravotní problémy. Obě onemocnění jsou ale zároveň rizikovými faktory vzniku nejen DM2T, ale také dyslipidémie, kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny (prsů, prostaty a tlustého střeva), hypertenze, syndromu polycystických vaječníků a spánkové apnoe [9].

2.1.2 Adipokiny

Tuková tkáň není jen místem pro uložení energie, ale taky důležitým endokrinním orgánem. Produkci látek souhrnně označovaných jako adipokiny (adipocytokiny) tuková tkáň ovlivňuje kardiovaskulární funkce, citlivost k inzulínu, zánětlivé reakce a funkci tukové tkáně samotné. Přehled adipokinů, které mají vliv na citlivost k inzulínu, je uveden v Tabulce 2. Uvolnění prozánětlivých cytokinů, nadměrného množství FFA a určitých adipokinů z tukové tkáně podporuje syntézu toxických lipidových metabolitů, narušuje metabolismus glukózy a syntézu svalového ATP (adenosintrifosfát) a mění signalizaci inzulínu [8, 10, 11].

Tabulka 2 Adipokiny ovlivňující citlivost k inzulínu. Převzato a upraveno z [2,3].

Leptin	TNF- α
Rezistin	Interleukin 6
Adiponektin	Visfatin
PAI-1	Adipsin
MCP-1	RBP-4

MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1, PAI-1 – plazminogen activator inhibitor 1, RBP-4 – retinol binding protein 4, TNF- α – tumor necrosis factor α

Leptin se syntetizuje zejména v tukové tkáni. V játrech, žaludku nebo svalu se tvoří také, ale pouze v malém množství. Leptin působí na centrum sytosti v hypotalamu a ovlivňuje tak příjem potravy a výdej energie. Hladiny leptinu se zvyšují po jídle a u obézních pacientů. Vyšší koncentrace u obézních pacientů jsou způsobeny rezistencí k leptinu. Mechanismus rezistence není zcela jasný, ale zřejmě dochází k defektům v signalizaci leptinu nebo jeho transportu přes hematoencefalickou bariéru. Nepříznivě působí leptin na β -buňky pankreatu. Snižuje jejich schopnost uvolňovat inzulín v reakci na hladiny glukózy v krvi. Naopak vzniku IR brání ve svalové tkáni, kde vyvolává zvýšení oxidace uložených TG, a v játrech, kde snižuje syntézu TG. Leptin také podporuje proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk, u buněk imunitního systému mění produkci cytokinů, stimuluje růst endotelových buněk a urychluje hojení ran [11, 12].

Adiponektin je protizánětlivý adipokin, který produkují zralé adipocyty. Ovlivňuje metabolismu glukózy, lipidů a správnou funkci cév. Má významné inzulín-senzitivní, protizánětlivé a antiaterogenní účinky. Inhibuje transformaci makrofágů v pěnové buňky a tlumí sekreci TNF- α a C-reaktivního proteinu (CRP). V endotelu cév snižuje expresi adhezivních molekul, potlačuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a naopak zvyšuje tvorbu oxidu dusnatého (NO). V játrech adiponektin zlepšuje citlivost k inzulínu zvýšením oxidace mastných kyselin (FA), snížením příjmu FFA a potlačením glukoneogeneze. Adiponektin v krevním oběhu cirkuluje ve vysokých koncentracích. Jeho expresi v tukové tkáni inhibuje TNF- α a IL-6. Snížená koncentrace adiponektinu negativně koreluje s koncentrací TG, aterogenním indexem a sekrecí apolipoproteinů B a E. Nízké hladiny adiponektinu jsou spojeny s obezitou, IR, dyslipidémií, ischemickou chorobou srdeční nebo jaterní cirhózou [11, 13, 14].

TNF- α představuje důležité propojení mezi obezitou, zánětem a IR. U obézních lidí se jeho exprese zvyšuje. TNF- α ovlivňuje genovou expresi v metabolicky důležitých tkáních. V tukové tkáni potlačuje geny podílející se na vychytávání a ukládání FFA a glukózy. Mění také expresi řady látek vylučovaných adipocyty. V játrech potlačuje expresi genů pro oxidaci FA a zvyšuje expresi genů podílejících se na *de novo* syntéze cholesterolu a FA. Nadprodukce TNF- α vyvolává apoptózu β -buněk pankreatu. TNF- α přímo porušuje inzulínovou signalizaci aktivací serinových kináz, které fosforylují substráty inzulínového receptoru a tím je inaktivují. Zároveň aktivací lipolýzy a inhibicí lipoproteinové lipázy (LPL) TNF- α zvyšuje v oběhu hladiny FFA [11, 15, 16].

IL-6 je prozánětlivý cytokin, který produkují různé typy buněk, včetně buněk imunitního systému, fibroblastů, myocytů nebo buněk endotelu. Na rozdíl od TNF- α se IL-6 vyskytuje v plazmě ve vysokých koncentracích, přičemž asi jedna třetina pochází z tukové

tkáně. Expresi IL-6 ovlivňuje TNF- α . Uvádí se, že u obézních pacientů zvyšuje jeho produkci až 60x. Nárůst IL-6 v oběhu vyvolává IR v periferních tkáních tím, že snižuje expresi komponent zapojených v inzulínové signalizaci. Vysoké hladiny IL-6 snižují sekreci adiponektinu a zvyšují uvolňování FFA z tukové tkáně. Produkce IL-6 může být snížena konzumací omega-3 nenasycených mastných kyselin jako je kyselina eikosapentaenová nebo kyselina dokosaheptaenová [7, 11, 12, 17].

2.1.3 Zánět

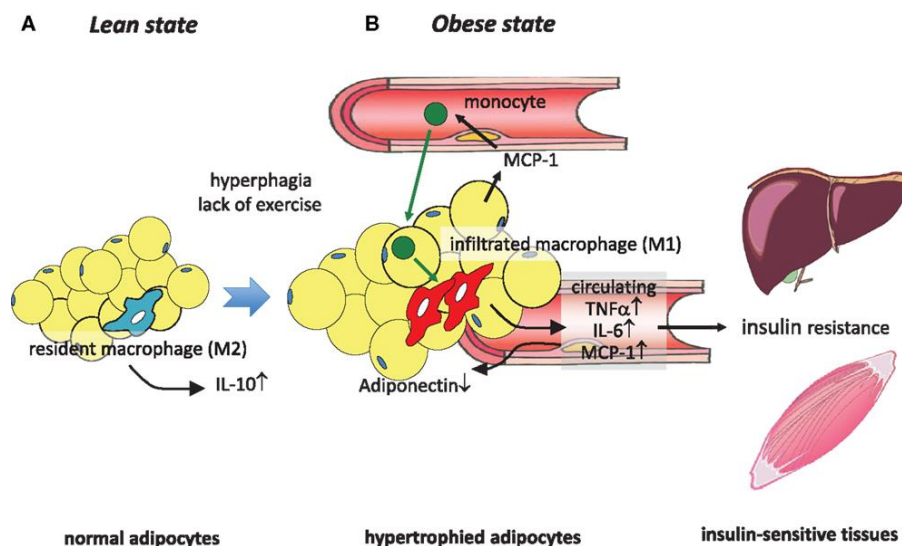
Obezita je spojena s mírným stupněm chronického zánětu. Zánětlivá reakce začíná v adipocytech, protože tyto buňky jsou ovlivněny vznikem a vývojem obezity jako první. Při obezitě dochází k výrazným změnám v architektuře tukové tkáně. Zvyšuje se syntéza bílkovin a lipidů. Vysoké požadavky na endoplazmatické retikulum vedou k přetížení jeho funkční kapacity. Přetížení endoplazmatického retikula má za následek aktivaci serin/threoninových kináz, které vedou ke vzniku a rozvoji IR [18].

Serin/threoninové kinázy mohou být aktivovány zánětlivými nebo stresovými podněty. Uplatňují se většinou stejné kinázy jako u přenosu signálu v imunitních reakcích. Mezi nejvýznamnější kinázy patří: JNK (c-Jun N-terminal kinase), IKK (inhibitor NF- κ B) a PKC (proteinkináza C). Přetížení endoplazmatického retikula vyvolané cytokiny nebo FA aktivuje JNK, která fosforylací substrátů inzulínového receptoru porušuje inzulínovou signalizaci. Při obezitě se aktivita JNK zvyšuje v játrech, svalových buňkách a tukové tkáni. IKK a PKC θ potlačují účinek inzulínu v závislosti na množství intracelulárních metabolitů lipidů (DG, LC-CoA), které tyto kinázy aktivují [16, 18].

U obézních jedinců tuková tkáň produkuje vyšší množství prozánětlivých adipokinů jako je TNF α , MCP-1 nebo IL-1. Převaha těchto adipokinů vede k infiltraci tukové tkáně makrofágy M1, které produkcí prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6 TNF α) vedou ke vzniku a rozvoji IR. Naopak ve zdravém organismu přetrvávají v tukové tkáni protizánětlivé makrofágy M2. Schéma působení infiltrovaných makrofágů M1 zobrazuje Obrázek 1 na straně 21 [8].

Zánět hraje hlavní roli při rozvoji IR a vzniku DM2T. Abnormálně vysoké hladiny různých cytokinů, chemokinů nebo proteinů akutní fáze mohou být indikátory progresu těchto onemocnění. Nejčastějším používaným markerem pro hodnocení systémového zánětu je CRP. Tento protein akutní fáze se tvoří v játrech, leukocytech i tukové tkáni v reakci na řadu podnětů, zejména na zvýšení IL-6 a dalších prozánětlivých cytokinů. CRP není spojen pouze s IR

a DM2T. Využívá se k prognóze vývoje hypertenze, metabolického syndromu nebo kardiovaskulárních onemocnění [15, 16, 19].



Obrázek 1 Vznik IR působením infiltrovaných makrofágů M1. Převzato z [4].

IL-6 – interleukin 6, IL-10 – interleukin 10, MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1, TNF α – tumor necrosis factor α

2.2 Projevy inzulínové rezistence

Účinky inzulínu na jednotlivé tkáně a orgány jsou rozdílné. Snížené působení inzulínu má řadu projevů, které se liší v závislost na fyziologické funkci příslušné tkáně a orgánu. Na působení inzulínu jsou nejvíce závislá játra a svalová tkáň [5].

2.2.1 Tuková tkáň

Inzulín má v tukové tkáni řadu funkcí. Stimuluje vychytávání glukózy, podporuje příjem lipidů a syntézu TG. Inhibicí hormon senzitivní lipázy inzulín potlačuje hydrolyzu TG a uvolňování FFA a glycerolu do oběhu. IR se v tukové tkáni projevuje nedostatečným potlačením lipolýzy, které má za následek zvýšení FFA v krevním oběhu. Nadměrná koncentrace FFA vede k ektopickému ukládání tuku do míst jako jsou játra, pankreas, cévní stěna a další tkáně. Uložení tuku ve tkáních je příčinou vzniku IR, protože způsobuje narušení inzulínové signalizace. Prostřednictvím Toll-like receptorů FFA indikují v tukových buňkách zánětlivé signály, které přispívají k potlačení působení inzulínu [2, 10, 20].

2.2.2 Svalová tkáň

Hlavním místem inzulín-stimulovaného příjmu glukózy je kosterní svalovina. Získaná glukóza se ve svalu převádí na glykogen nebo vstupuje do glykolýzy. K syntéze glykogenu se využívá přibližně 75 % přijaté glukózy. Narušená syntéza glykogenu je jedním z nejčastějších metabolických defektů pozorovaných při IR. Inzulín za fyziologických podmínek ve svalu podporuje syntézu glykogenu aktivací glykogensyntázy. Současně vyvolává zvýšení vychytávání glukózy z oběhu a potlačuje katabolismus proteinů [21, 22].

Kosterní svaly využívají jako zdroj energie glukózu i FFA. Během hladovění představují FFA hlavní zdroj energie. Když se po jídle hladina glukózy a inzulínu zvyšuje, ve svalu stoupá využití glukózy. Oxidace lipidů se snižuje, protože inzulín potlačuje lipolýzu a hladiny cirkulujících FFA klesají. Zvýšená koncentrace FFA v oběhu způsobená nedostatečnou inhibicí lipolýzy v tukové tkáni snižuje schopnost svalů vychytávat a oxidovat glukózu. Nadměrný příjem FFA vede k hromadění lipidů uvnitř svalových buněk a vzniku IR [23].

Pro vznik IR v kosterní svalů je klíčový obsah lipidových metabolitů (LC-CoA, DG, ceramidy). Citlivost k inzulínu může být narušená, i když je koncentrace TG uvnitř svalových buněk zvýšená. Tento stav je typický pro sportovce. Pravidelné cvičení je spojeno s nárůstem počtu mitochondrií a jejich kapacitou pro oxidaci FA, čímž se zabrání akumulaci DG a ceramidů. Kosterní svalovina je výjimečná tím, že zvýšením fyzické aktivity se může IR překonat. Lipidové metabolity aktivují ve svalových buňkách proteinové kinázy (PKC, IKK β , JNK), které fosforylací inzulínového receptoru a jeho substrátů brání přenosu signálu. Zároveň mohou proteinové kinázy ovlivnit tvorbu prozánětlivých cytokinů. Cytokiny, které mají vliv na vývoj IR ve svalech, pocházejí především z tukové tkáně a jater, protože na rozdíl od tukové tkáně je při IR v kosterním svalů infiltrace makrofágů velmi malá [1, 23, 24].

Nadbytečný příjem FFA vyvolává ve svalové buňce *de novo* syntézu ceramidů. Vhodným substrátem pro jejich syntézu je kyselina palmitová. Syntézu ceramidů indukují glukokortikoidy, TNF α , nebo nasycené mastné kyseliny (SFA). Hladiny ceramidů se zvyšují při obezitě a jsou spojeny s nižší oxidační kapacitou mitochondrií. Ceramidy se také uplatňují v zánětlivých reakcích, apoptóze nebo při oxidačním stresu [20, 25].

Akumulace DG v buňce je způsobena nadměrným příjmem FFA a zvýšenou aktivitou fosfolipázy C v důsledku hyperglykémie. Vliv DG na působení inzulínu může být ovlivněn jejich složením a lokalizací. Vzhledem k tomu, že nežádoucí účinky PKC jsou spojeny s buněčnou membránou, je pravděpodobné, že pouze DG umístěné v blízkosti membrány mohou aktivovat PKC [26].

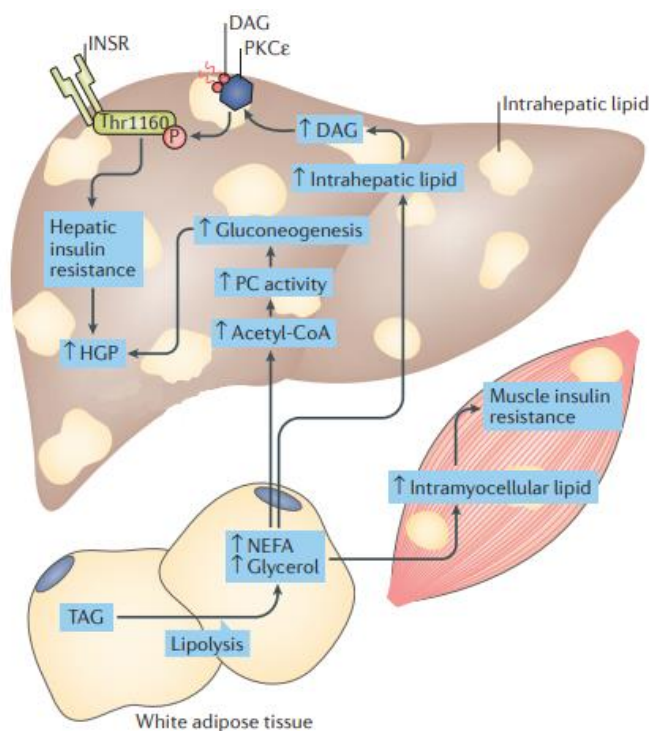
Rostoucí koncentrace FA ve svalových buňkách vyvolává zvýšení exprese genů pro β -oxidaci, které ale není koordinováno s následným citrátovým cyklem a transportem elektronů. Výsledkem je přetížení mitochondrií, ve kterých se hromadí vedlejší produkty nedokonalé β -oxidace (acylkarnitin, ROS). Přetížení mitochondrií může vést k aktivaci serinových kináz, které brání translokaci glukózových přenašečů. ROS přímo poškozují mitochondrie. Mohou také fungovat jako signální molekuly, které se podílejí na aktivaci proteinových kináz fosforylující substráty inzulínového receptoru. IR je spojena také se sníženou rychlostí syntézy ATP. Defekt v syntéze je způsoben snížením počtu mitochondrií s normální funkcí. Jedinci s IR mají mitochondrie s řadou morfologických abnormalit, které lze snížením hmotnosti a zvýšenou fyzickou aktivitou odstranit [23, 27, 28].

2.2.3 Játra

Játra jsou schopná vylučovat glukózu z oběhu závisle i nezávisle na inzulínu. Působení inzulínu je ale nutné pro regulaci zde probíhajících metabolických procesů. Inzulín v játrech potlačuje tvorbu glukózy a stimuluje syntézu glykogenu, lipidů a proteinů. Glukoneogeneze v játrech představuje přibližně 90% endogenní produkce glukózy a je rozhodující pro systémovou homeostázu glukózy. Tvorba glukózy v játrech slouží k udržení euglykémie a jako palivo pro buňky (především pro erytrocyty a neurony). V játrech inzulín potlačením glukoneogeneze a zvýšením rychlosti syntézy glykogenu snižuje hodnotu glykémie. Inzulín stimuluje syntézu glykogenu aktivací glukokinázy a glykogensyntázy. Glukoneogeneze je regulována dostupným množstvím substrátů (glycerol), alostericky metabolity (acetylCoA) a hormonálně (inzulín, glukagon, katecholaminy). Jaterní IR je stav, při kterém inzulín nepotlačuje tvorbu glukózy a dále stimuluje lipogenezi. Výsledkem nedostatečného působení inzulínu je hyperglykémie, hyperlipidemie a jaterní steatóza. Schopnost inzulínu tlumit produkci glukózy v játrech je spojena s potlačením lipolýzy v tukové tkáni. Inhibicí lipolýzy inzulín omezuje dodávku glycerolu a FFA do jater [22, 29, 30].

Nadměrný příjem FA do jater podporuje tvorbu glukózy. FA slouží jako zdroj energie pro glukoneogenezi a zvýšené množství acetylCoA vzniklého z FA aktivuje pyruvátcarboxylázu (viz Obrázek 2). Zároveň roste tvorba TG v důsledku zvýšeného příjmu, esterifikace a *de novo* syntézy FA. Prekurzorem pro tvorbu FA je malonylCoA, který v nadbytku inhibicí karnitinpalmitoyltransferázy 1 snižuje β -oxidaci FA v mitochondriích. β -oxidace je zároveň inhibována účinkem inzulínu, který je při jaterní IR zachován. LC-CoA vzniklé z malonylCoA nepodléhají tedy β -oxidaci, ale slouží k syntéze TG. Snížení oxidace FA má za následek hromadění TG ale i dalších lipidových metabolitů, jako jsou ceramidy, DG

a LC-CoA. Akumulace DG v játrech aktivuje PKC, která fosforylací inzulínového receptoru vyvolává IR (viz Obrázek 2). Mechanismus spojující ceramidy s IR v játrech není zcela jasný, ale zvýšené hladiny ceramidů se vyskytují společně s jaterní IR. Lipidy indukovaná IR je spojená se zánětem a jaterní steatózou. V reakci na zánětlivé cytokiny (TNF α , IL-6) produkované tukovou tkání, se v játrech zvyšuje syntéza CRP, fibrinogenu nebo PAI-1 (inhibitor plazminogenového aktivátoru 1) [7, 22, 30, 31].



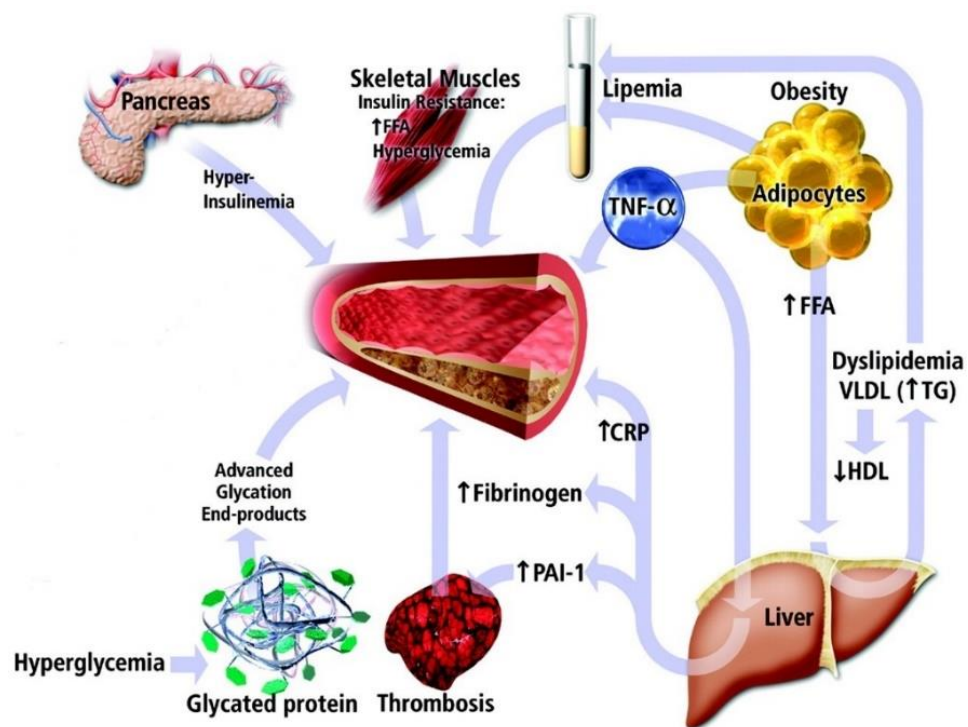
Obrázek 2 Schéma vzniku inzulínové rezistence vyvolané akumulací lipidů. Převzato a upraveno z [5].
DAG – diacylglycerol, HGP – jaterní produkce glukózy, INSR – inzulínový receptor, NEFA – neesterifikované mastné kyseliny, PC – pyruvátcarboxyláza, PKC ϵ – proteinkináza C ϵ , TAG – triacylglycerol

2.2.4 Endotel a cévy

Hyperinzulinémie, hyperglykémie a dyslipidémie doprovázející IR narušují normální funkci cév a společně se podílí na vzniku aterosklerózy. Inzulín stimulací tvorby NO působí na cévy vazodilatačně. NO inhibuje agregaci krevních destiček, adhezi buněk a proliferaci hladké svaloviny. Syntéza NO v endotelu probíhá prostřednictvím eNOS (endotelová NO syntáza). Hyperglykémie snižuje tvorbu NO zvýšením produkce ROS, které degradují eNOS. Aktivita eNOS je snížena také působením FFA a TNF α . Hyperglykémie spolu se zvýšeným oxidačním stresem jsou příčinou neenzymatické glykace proteinů i lipidů. Glykované proteiny mohou vytvářet struktury označované jako AGE (Advanced Glycation End-products), které se akumulují v cévách a přispívají k rozvoji cévních komplikací. Vysoké hladiny AGE mohou

v buňkách endotelu vyvolat produkci zánětlivých cytokinů a zvýšit expresi adhezních molekul. Glykace lipoproteinů s nízkou hustotou přímo souvisí se vznikem aterosklerózy. Hyperinzulinémie je spojena se zvýšenou hladinou pro-koagulačních faktorů, jako je například PAI-1 nebo fibrinogen [22, 32].

Zatímco jsou metabolické účinky inzulínu v endotelu při IR porušeny, mitogenní nikoliv. Proliferace hladké svaloviny v cévách spolu s nadměrnou produkcí prozánětlivých cytokinů urychluje proces aterosklerózy. Schéma vlivu jednotlivých složek IR na vznik aterosklerózy zobrazuje Obrázek 3 [32].



Obrázek 3 Vliv IR na vznik aterosklerózy. Převzato a upraveno z [6].

CRP – C-reaktivní protein, FFA – volné mastné kyseliny, HDL – lipoprotein s vysokou hustotou, PAI-1 - inhibitor plazminogenového inhibitoru 1, TG – triacylglycerol, TNF α – tumor necrosis factor α , VLDL – lipoprotein s velmi nízkou hustotou

2.2.5 β -buňky

Hyperglykémie a dlouhodobě zvýšené hladiny FFA působí na β -buňky toxicky. Chronická hyperglykémie poškozuje glukózou indukovanou sekreci inzulínu a snižuje expresi inzulínového genu. Účinek FFA na funkci β -buněk závisí na jejich chemické povaze, koncentraci a době expozice. SFA poškozují funkci β -buněk, zvyšují fragmentaci DNA, snižují glukózou stimulovanou sekreci inzulínu, proliferaci a životaschopnost β -buněk. Většina účinku SFA je zprostředkována působením ceramidů a generováním ROS. Naopak nenasycené FA

působí protektivně. Účinky FA ovlivňuje hodnota glykémie. Pokud je koncentrace glukózy v oběhu ve fyziologickém rozmezí, jsou zvýšené hladiny FA v β -buňce snadno oxidovány a nevyvolávají poškození [33, 34].

2.3 Diagnostika

V současnosti je k diagnostice IR nejspolehlivější euglykemický hyperinzulinemický clamp. Jedná se o metodu, která se pro svoji náročnost, vysokou cenu a možná rizika používá především pro výzkumné účely. Provedení testu spočívá v konstantní aplikaci inzulínu, za účelem vzniku hyperinzulinémie. Zároveň se podle aktuální hodnoty glykémie upravuje rychlost infuze glukózy, tak aby se dosáhlo ustálené hodnoty glykémie. Poté se změří množství spotřebované glukózy. Čím vyšší je spotřeba glukózy k udržení stálé hodnoty glykémie, tím vyšší je citlivost k inzulínu [5, 35].

Další možností, jak stanovit IR, je použít indexy citlivosti k inzulínu (HOMA-IR, QUICK index, McAuley index a další). K výpočtu indexů je nutné znát koncentraci inzulínu, glukózy, C-peptidu nebo TG v plazmě. Indexy se běžně používají v epidemiologických studiích k předpovědi vývoje diabetu v populaci. V klinické praxi je jejich použití omezeno nepřítomností referenčních hodnot pro normální a sníženou citlivost k inzulínu. V praxi se k diagnostice IR běžně používá stanovení koncentrace inzulínu nalačno. Jedná se o jednoduchou metodu, která ale není vhodná pro pacienty s exogenní aplikací inzulínu. U těchto pacientů se doporučuje stanovit množství C-peptidu. Vyšetření C-peptidu slouží jako ukazatel sekreční funkce β -buněk pankreatu. Součástí diagnostiky IR jsou i další vyšetření jako je stanovení glykémie (nalačno, náhodně nebo v rámci orálního glukózového tolerančního testu (OGTT)), lipidového profilu, množství glykovaného hemoglobinu nebo hladiny CRP [5, 36].

2.4 Léčba

Citlivost k inzulínu lze ovlivnit redukcí tělesné hmotnosti, pravidelnou fyzickou aktivitou a složením stravy. I mírná ztráta hmotnosti (5-10%) zlepšuje citlivost k inzulínu, má pozitivní účinky na lipidový metabolismus a snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. Zvýšená fyzická aktivita ovlivňuje pozitivně také dyslipidemii a snižuje krevní tlak. Změny ve složení stravy zahrnují snížení příjmu potravin bohatých na SFA, cholesterol a jednoduché cukry. Naopak se doporučuje zvýšit přísun nenasycených FA, které výrazně snižují zánětlivé parametry. Důležité je také omezit konzumaci alkoholu a přestat kouřit [37, 38].

I když má změna životního stylu velký význam, je u řady pacientů s IR nutné použít farmakologickou léčbu. Látky, které ovlivňují IR, tím že zlepšují účinek inzulínu v periferních

tkáních, se označují jako inzulínové senzitivizéry. Zástupcem této skupiny léků je metformin a thiazolidindiony (TZD) [5].

TZD, též označované jako glitazony, jsou perorální antidiabetika, která zlepšují citlivost k inzulínu prostřednictvím PPAR- γ (receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem gama). PPAR jsou jaderné transkripční faktory, které regulují expresi řady genů podílejících se na metabolismus sacharidů, lipidů nebo zánětlivé reakci. TZD primárně působí v tukové tkáni, kde podporují diferenciaci adipocytů a zvyšují tvorbu adiponektinu. Zároveň snižují hladinu FFA, zvyšují rezistenci LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou) k oxidaci, vyvolávají redistribuci tuků z viscerální oblasti do subkutánní, zpomalují aterogenezi a mají protizánětlivé účinky. Přestože nejsou TZD určeny k léčbě dyslipidemie, snižují koncentraci TG a malých LDL částic s vyšší hustotou. Zásadním nežádoucím účinkem TZD je nárůst tělesné hmotnosti a zadržování tekutin [32, 38, 39].

Metformin primárně působí v játrech, kde vyvolává potlačení glukoneogeneze. Přesný molekulární mechanismus účinku je stále nejasný. Vědci se domnívají, že působí na transkripční faktory, které regulují expresi glukogenních genů. Jiná hypotéza předpokládá, že metformin inhibicí mitochondriálního komplexu I vyvolává inaktivaci klíčového glukogenního enzymu fruktózy-1,6bisfosfatázy. Ve svalové a tukové tkáni metformin stimulací glukózových přenašečů podporuje transport glukózy do buněk. Léčba metforminem snižuje riziko vzniku nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. Metformin má pozitivní účinky na metabolismus lipidů a sacharidů, snižuje tělesnou hmotnost a zlepšuje funkci krevních destiček. Minimální denní dávka metforminu je 500 mg, maximální 3000 mg [30, 38].

Pokud farmakologická léčba není dostatečně účinná, je možné využít chirurgické zákroky na trávicím traktu. Jedná se o invazivní výkony, které slouží k dlouhodobému snížení tělesné hmotnosti. Po zákroku u pacientů dochází také ke zlepšení IR, a to už během několika dnů až týdnů. V bariatrické chirurgii se provádí dva typy výkonů: restriční a malasorpční. V České republice je více než 90 % výkonů restričních, které jsou založené na omezeném příjmu potravy. Bariatrická chirurgická léčba by v budoucnu mohla být možností, jak trvale nebo alespoň dlouhodobě eliminovat IR [5].

3 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus je metabolické onemocnění projevující se hyperglykémii v důsledku poruchy sekrece a/nebo účinku inzulínu. Nedostatečné působení inzulínu na cílové tkáně vede k abnormalitám v metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů. Vysoké hodnoty glykémie se projevují nejprve nespecifickými příznaky (slabost, únava, žízeň, častější močení), které mohou při extrémních hodnotách glykémie přecházet v závažnější stavy (poruchy vědomí, kóma). Dlouhotrvající diabetes je spojen s řadou komplikací, zejména s postižením cév (neuropatie, retinopatie, nefropatie). Hlavní příčinou mortality u diabetiků jsou makrovaskulární onemocnění [40].

Příčiny vzniku diabetes mellitus jsou různé. Uplatňují se genetické vlivy i enviromentální. Rozdělení diabetes mellitus do jednotlivých kategorií dle etiologie je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Rozdělení diabetes mellitus dle etiologie [7].

Diabetes mellitus 1. typu	způsobený destrukcí β -buněk, obvykle vedoucí k absolutnímu nedostatku inzulínu
Diabetes mellitus 2. typu	vzniká v důsledku postupné ztráty sekrece inzulínu na pozadí inzulínové rezistence
Gestační diabetes mellitus	diabetes diagnostikovaný v druhém nebo třetím trimestru těhotenství
ostatní specifické typy diabetu související s jinými poruchami, syndromy a stavy	

Základním kritériem pro diagnostiku diabetes mellitus je stanovení koncentrace glukózy v krvi (nalačno, příležitostně během dne nebo 2 hodiny po OGTT). O diabetes mellitus se jedná v případě, že hladina glukózy v krvi přesáhne nalačno 7 mmol/l nebo je 2 hodiny po OGTT a kdykoliv během dne vyšší než 11mmol/l. K potvrzení diagnózy se může stanovit i hladina glykovaného hemoglobinu HbA1c. Dále mohou být provedeny testy na sekreci inzulínu, IR a analýza autoprotiátok a HLA antigenů. Kromě těchto vyšetření jsou důležité i informace o rodinné anamnéze, tělesné hmotnosti, lipidovém profilu a hodnotě krevního tlaku [40].

3.1 Diabetes mellitus 2. typu

DM2T dříve označovaný jako non-inzulín dependentní je nejčastější formou diabetes mellitus, která se obvykle projevuje ve středním věku. V posledních letech v důsledku obezity však stoupá výskyt diabetu u dětí a dospívajících. Jedná se o heterogenní onemocnění, jehož základem je IR. Samotná IR však ke vzniku DM2T nevede. K rozvoji DM2T dochází až při nedostatečné sekreci inzulínu, která je způsobena sníženou funkcí a počtem β -buněk pankreatu. Během IR dochází k poškození β -buněk dlouhotrvajícím působením vysokých hladin FFA a glukózy [3, 41].

V současnosti se počet diabetiků 2. typu rapidně zvyšuje. Nárůst onemocnění je spojen především se změnou životního stylu (nedostatek fyzické aktivity, nadměrná konzumace potravin s vysokým obsahem tuku, kouření, vyšší spotřeba alkoholu). Vznik DM2T je výsledkem společného působení genetických a environmentálních faktorů. Obezita a nadváha jsou nečastější příčinou, protože přímo souvisí se vznikem a rozvojem IR a progresí DM2T. Mezi další rizikové faktory patří hypertenze, dyslipidémie, rostoucí věk, rodinná anamnéza a řada dalších faktorů. Zvýšené riziko vzniku DM2T mají ženy s diagnostikovaným gestačním diabetes mellitus [42].

DM2T je charakterizován hyperglykemií a zvýšenou hladinou FFA. Výskyt DM2T je spojen s řadou abnormalit jako je centrální obezita, dyslipidémie, hyperinzulinémie, hypertenze, zvýšení zánětlivých markerů, vaskulární abnormality, snížení koncentrace adiponektinu v oběhu a zhoršení fibrinolýzy. Souhrnně se tato skupina abnormalit označuje jako syndrom inzulínové rezistence (metabolický syndrom) [2].

Protože většina diabetiků 2. typu má nadváhu nebo obezitu, primárním cílem léčby je snížit jejich tělesnou hmotnost. Zásahy do životního stylu mohou u rizikových jedinců zabránit nebo alespoň zpomalit vznik DM2T. V dnešní době se u nově diagnostikovaných pacientů s DM2T současně s úpravou životního stylu zahajuje léčba farmakologická. Lékem první volby je metformin. Jedná se o perorální antidiabetikum, které patří to skupiny léků zvyšující citlivost k inzulínu v periferních tkáních. Druhou skupinu antidiabetik tvoří léky zvyšující sekreci inzulínu. Přehled jednotlivých antidiabetik a jejich vlastností je popsán v Tabulce 4 na straně 30. Dále se léčbě k DM2T mohou použít inkretiny nebo jejich analoga. Zkoumají se také látky, které by působením na inzulínové receptory zvýšily jeho účinek a sekreci. Tato skupina léků se označuje jako inzulínová mimetika. Na nová antidiabetika je kladena řada požadavků. Léky by měly redukovat tělesnou hmotnost, pozitivně ovlivnit hladiny lipidů, snížit krevní tlak a množství glykovaného hemoglobinu a zároveň být pro pacienta bezpečné [42, 43, 44].

Tabulka 4 Přehled antidiabetik a jejich vlastností [8, 9, 10].

Metformin	inhibuje glukoneogenezi
	podporuje transport glukózy do svalových a tukových buněk
	nepřímo zlepšuje funkci β -buněk pankreatu
Thiazolidindiony (glitazony)	podporují diferenciaci adipocytů
	zvyšují produkci adiponektinu
	snižují lipolýzu
	ovlivňují zánětlivé procesy v cévní stěně
Deriváty sulfonylurey	zvýšením obsahu vápníku β -buňkách stimuluji sekreci inzulínu
	potlačují uvolňování glukózy z jater
	při glykémii $>15\text{mmol/l}$ ztrácí účinek
Deriváty meglitinidů (glinidy)	stimulují sekreci inzulínu
	rychlý nástup účinku ale působí krátce
Inhibitory DPP-4 (gliptiny)	prodlužují účinek endogenních inkretinů (GLP-1)
	zvyšují tvorbu inzulínu pouze při hyperglykémii
	snižují jaterní glukoneogenezi
Inhibitory α-glukosidázy	zpomalují štěpení a resorpci sacharidů ve střevě
	působí pouze lokálně
	často se používají pouze jako doplňková léčba
Analoga GLP-1	účinky odpovídají GLP-1: snižují glykémii, glykovaný hemoglobin, FFA, hmotnost, chuť k jídlu a sekreci glukagonu
	mají příznivý účinek na β -buňky
	podávají se injekčně
Inhibitory SGLT-2 (glifloziny)	blokují v ledvinách zpětné vychytávání glukózy
	vyvolávají snížení krevního tlaku, množství glykovaného hemoglobinu a tělesné hmotnosti

DPP-4 – dipeptidyl-peptidáza 4, GLP-1 – glukagonu podobný peptid 1, FFA – volné mastné kyseliny

4 LIPIDY

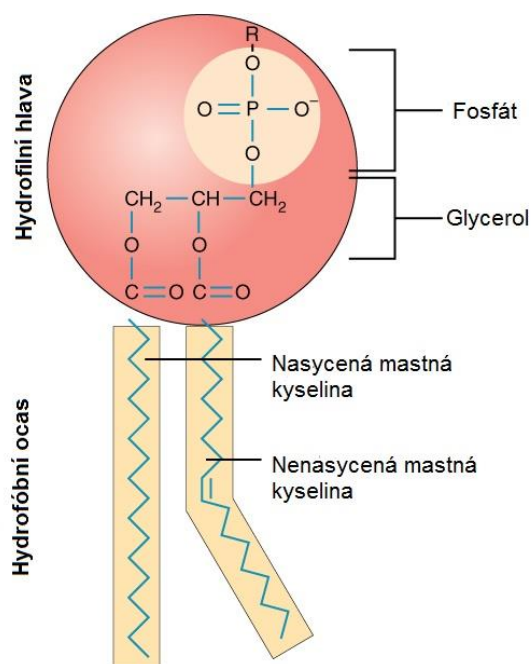
Lipidy jsou velká a heterogenní skupina biologických látek, které jsou obecně hydrofobní povahy. Snadno se rozpouštějí v organických rozpouštědlech, jako je methanol, aceton, benzen nebo chloroform. Lipidy lze rozdělit dle řady kritérií. Nejčastěji používané dělení je na jednoduché a složené. Jednoduché lipidy jsou tvořeny pouze vyšší mastnou kyselinou a alkoholem, složené lipidy pak obsahují navíc ještě další složku (sacharidovou, fosfátovou nebo proteinovou). Pro lidský organismus představují lipidy důležitý zdroj energie. Jejich uložení v tukové tkáni slouží zároveň jako mechanická a tepelná izolace. Lipidy jsou také součástí buněčných struktur, především membrán. Některé typy lipidů a látek z nich odvozených slouží v těle jako hormony, mediátory nebo druzí poslové. Lipidy jsou důležitou složkou potravy nejen pro svou vysokou energetickou hodnotu, ale slouží také jako zdroj esenciálních FA a vitamínů rozpustných v tucích. Narušení nebo nerovnováha metabolismu lipidů může vést k řadě onemocnění jako je ateroskleróza, jaterní steatóza nebo diabetes mellitus [45].

4.1 Fyziologicky významné lipidy

4.1.1 Fosfolipidy

Jedná se o skupinu složených lipidů. Hlavní třídu fosfolipidů (PL) tvoří glycerolfosfolipidy. Jejich základem je kyselina fosfatidová (1,2-diacylglycerol-3-fosfát). Hydroxylové skupiny glycerolu jsou esterifikovány FA s dlouhým řetězcem (16-20 atomů uhlíku). Řetězec připojený na první uhlík glycerolu je obvykle nasycený, na druhém uhlíku nenasycený. PL jsou hlavní složkou buněčných membrán. Rozdíly v délce a sytosti navázaných FA ovlivňují tekutost membrány, propustnost iontů a vazbu k inzulínovému receptoru. V membránách je hydrofobní část molekuly (řetězce FA) spojena s jinými nepolárními částmi membrány (glykolipidy, proteiny, cholesterol). Zatímco hydrofilní část (fosfátová hlava) směřuje ven a umožňuje tak komunikaci mezi extra- a intracelulárním prostorem. Struktura PL je znázorněna na Obrázku 4 na straně 32. Kromě toho, že PL slouží jako hlavní složka buněčných membrán, podílejí se i na přenosu signálu v buňce. Působením fosfolipáz spojených s membránou vznikají z PL druzí poslové (DG, lyzofosfolipidy, FFA), které mohou v buňce regulovat řadu funkcí [6, 32, 46].

Kyselina fosfatidová je nejjednodušším fosfolipidem a slouží jako prekurzor. Fosfátová skupina na třetím uhlíku glycerolu je esterifikován alkoholem. Podle typu navázaného substituentu na fosfát rozlišujeme: fosfatidylserin, fosfatidylcholin (lecithin), fosfatidylethanolamin (cephalin) a fosfatidylinositol [6].



Obrázek 4 Struktura fosfolipidu. Převzato a upraveno z [11].

Složení FA obsažených v membránových PL ovlivňuje i účinek inzulínu. Vyšší výskyt SFA, jako je kyselina stearová nebo kyselina palmitová, má pozitivní korelaci s IR. Naopak přítomnost nenasycených FA působí protektivně [47].

4.1.2 Triacylglyceroly

TG jsou estery glycerolu a vyšších FA. Esterifikací FA ztrácejí náboj a vzniklý tuk je neutrální. Hydroxylové skupiny glycerolu nemusí být esterifikovány všechny. Připojením pouze jedné FA vznikají monoacylglyceroly, dvou DG. U TG nejsou většinou esterifikované FA stejné. Na první uhlík glycerolu se váže kyselina nasyčená, na druhý nenasycená. FA na třetím uhlíku může být libovolná. Mezi nejčastěji zastoupené FA patří kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina olejová nebo kyselina linolová. Délka FA a počet dvojných vazeb v řetězci ovlivňuje teplotu tání. Čím kratší je FA a čím vyšší počet dvojných vazeb má, tím je teplota tání nižší. Pokud jsou TG při pokojové teplotě kapalné označují se jako oleje. V případě, že jsou tuhé, nazývají se tuky. TG jsou nepolární a hydrofobní látky. Hydrolyzou TG lipázami

vzniká glycerol a FFA, které slouží jako zdroj energie nebo se skladují ve formě TG [6, 45, 48].

Tvorba TG probíhá v tukové tkáni a játrech. V tukové tkáni jsou TG uloženy v cytoplazmě ve formě kapek. Takto uložené představují hlavní zásobárnu energie. Tukové kapky v hnědých adipocytech slouží také jako zdroj tepla. V játrech je za fyziologických podmínek uloženo jen malé množství TG. Většina produkovaných TG tvoří společně s apolipoproteiny a dalšími lipidy lipoproteinové částice, které jsou vylučovány z jater přímo do krve [6].

4.1.3 Mastné kyseliny

FA jsou karboxylové kyseliny, které se v těle vyskytují ve formě esterifikované (TG, PL, estery cholesterolu) i neesterifikované (volné). V krevním oběhu jsou estery FA součástí lipoproteinů, FFA jsou transportovány ve spojení s albuminem. FFA představují pouze malou část z celkového množství FA. Ke zvýšení hladin FFA dochází při hladovění nebo patologických stavech. Hlavním zdrojem FFA je tuková tkáň. FA jsou zde uloženy ve formě TG. Lipolýzou dochází k jejich uvolnění do krevního běhu. Dysregulace lipolýzy může vést k metabolickým abnormalitám jako je například DM, kardiovaskulární onemocnění nebo jaterní steatóza. Snížená lipolytická aktivita přispívá k akumulaci TG v tukové tkáni. Naopak nadměrná lipolýza vede k uvolnění nadbytečného množství FA do oběhu. Pokud jsou vysoké hladiny FFA v plazmě dlouhodobé, dochází k ektopickému ukládání TG do tkání [6, 43, 49, 50].

Lipolýza je regulovaná hormonálně. Inzulín inhibuje hormon senzitivní lipázu přítomnou v tukové tkáni. Naopak mezi aktivátory lipolýzy patří glukagon, adrenalin, noradrenalin, růstový hormon, glukokortikoidy nebo hormony štítné žlázy. Lipolýza je také ovlivňována hormony tukové tkáně [48].

FA lze rozdělit do skupin podle délky řetězce, polohy a počtu dvojných vazeb nebo původu. Podle počtu dvojných vazeb v řetězci se FA dělí na nasycené (neobsahují dvojnou vazbu), mononenasycené (mají jednu dvojnou vazbu) a polynenasycené (mají více než jednu dvojnou vazbu). Většina v těle přítomných nenasycených FA má dvojnou vazbu v cis-konfiguraci. Nenasycené FA lze rozdělit také podle polohy dvojných vazeb od koncového uhlíku. Pro číslování od konce uhlovodíkového řetězce se používá předpona omega. V lidském těle jsou nejvíce zastoupeny nasycené a mononenasycené FA se sudým počtem uhlíků v řetězci. Nejdelší FA obsahující více než 22 atomů uhlíku jsou přítomné v mozku [6, 46, 48].

Množství SFA ve stravě se v současnosti neustále zvyšuje. Hlavními zdroji SFA jsou živočišné produkty, jako je máslo, sádlo nebo kravské mléko. SFA jsou přítomné také v rostlinných produktech jako je čokoláda, kakaové máslo či kokosový a palmový olej. Nadměrná spotřeba SFA je pozitivně spojena s vysokou hladinou cholesterolu, zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění, s IR a řadou dalších onemocnění. Mezi nejčastěji zastoupené SFA patří kyselina myristová (C14:0), kyselina palmitová (C16:0) a kyselina stearová (C18:0). Syntéza těchto kyselin je stimulována zvýšeným příjmem sacharidů a alkoholu. SFA, především kyselina palmitová a stearová, působí toxicky na β -buňky pankreatu, kde aktivují expresi zánětlivých cytokinů a adhezních molekul. Snížením příjmu SFA či jejich nahrazením se citlivost k inzulínu výrazně zlepšuje [6, 51, 52].

Zdrojem nenasycených FA jsou rostlinné oleje a ryby. Mezi běžně přítomné mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA) ve stravě patří kyselina olejová (C18:1,n-9) a kyselina palmitoolejová (C16:1,n-7). MUFA snižují hladinu cholesterolu, krevní tlak, zlepšují funkci β -buněk a mají pozitivní vliv na IR. Nahrazení SFA ve stravě za MUFA zlepšuje citlivost na inzulín [6, 53].

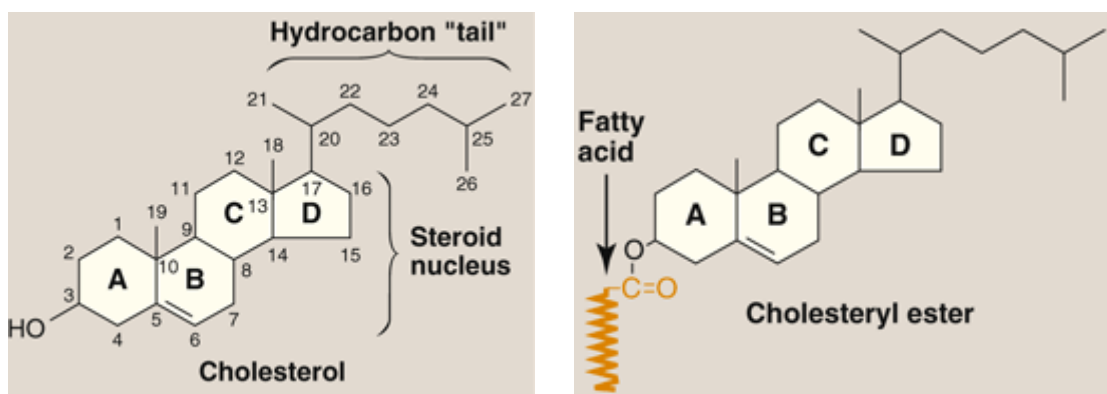
Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) také zlepšují citlivost k inzulínu, a to výrazněji než MUFA. Vysoký obsah PUFA (především omega-3) ve stravě inhibuje v játrech expresi lipogenních genů, stimuluje oxidaci FA a zlepšuje tak IR. Mezi zástupce omega-3 mastných kyselin patří kyselina eikosapentaenová (C20:5, ω -3), kyselina dokosaheptaenová (C22:6, ω -3) nebo kyselina α -linolenová (C18:3, ω -3). Omega-3 mastné kyseliny s dlouhým řetězcem mají protizánětlivé účinky a chrání organismus před vznikem kardiovaskulárních chorob řadou mechanismů: snižují agregaci trombocytů, inhibují interakce leukocyt-endotel a snižují syntézu prozánětlivých cytokinů. Přestože jsou vyšší hladiny celkových PUFA spojeny nižším rizikem diabetu, není zcela objasněn vztah omega-6 mastných a diabetu. Zástupcem omega-6 mastných kyselin je kyselina linolová (C18:2, ω -6), která má antiaterogenní vlastnosti. Mezi potraviny bohaté na kyselinu linolovou patří ořechy, olivy, avokádo a sójové boby. Kyselina linolová a kyselina α -linolenová jsou esenciální MK, které organismus potřebuje pro svoji správnou funkci [6, 46, 54].

Ve většině nenasycených FA je dvojná vazba v poloze cis. Zdrojem trans-nenasycených FA jsou hydrogenované rostlinné oleje, sušenky, a především smažené potraviny. Nejčastěji jsou ve stravě přítomné trans izomery kyseliny elaidové a vakcenové. Trans-nenasycené FA se svými vlastnostmi podobají SFA. Zvyšují hladiny cholesterolu, podílejí se na vzniku a rozvoji

IR a zvyšují riziko kardiovaskulárních onemocnění. Zhoršený účinek inzulínu je spojen s peroxidací lipidů a indukovaným zánětem [6, 46, 51].

4.1.4 Cholesterol

Cholesterol je významný živočišný steroidní alkohol. Jedná se o hydrofobní látku složenou ze steroidního jádra, ke kterému je navázán osmičlenný uhlovodíkový řetězec. Cholesterol je nenasycený alkohol s polohou dvojně vazby mezi C5-C6 a hydroxylovou skupinou na C3. V plazmě se cholesterol vyskytuje většinou ve formě esteru s FA. Strukturu cholesterolu a jeho esteru zobrazuje Obrázek 5. Protože je cholesterol hydrofobní látka, je v plazmě transportován jako součást lipoproteinových částic. Cholesterol se v těle vyskytuje ve všech tkáních a má řadu funkcí. Je významnou složkou buněčných membrán, slouží jako prekurzor pro tvorbu žlučových kyselin, steroidních hormonů a vitamínu D [6, 46].



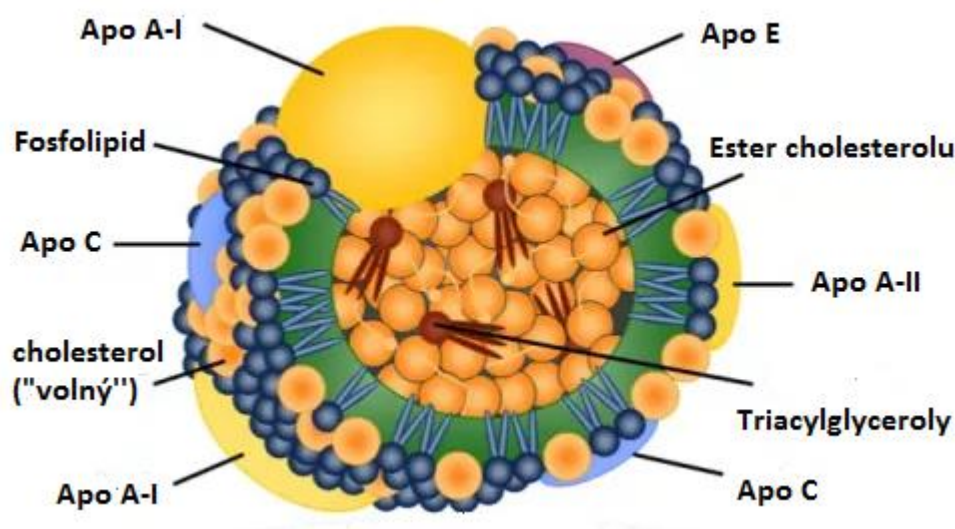
Obrázek 5 Struktura cholesterolu a cholesteryl esteru. Převzato a upraveno z [12].

V těle přítomný cholesterol pochází jak z endogenních (syntéza *de novo*), tak i z exogenních (absorpce cholesterolu ze stravy a žlučových cest) zdrojů. Syntéza cholesterolu může probíhat ve všech tkáních těla. V játrech, kůře nadledvin a reprodukčních tkáních je tvorba cholesterolu nejvyšší. Hlavním kontrolním bodem syntézy cholesterolu je enzym hydroxymeetylglutaryl-koenzymA reduktasa. Inzulín a thyroxin vyvolávají zvýšení exprese tohoto enzymu, glukagon a glukokortikoidy působí opačně. Játra hrají důležitou roli v regulaci hladiny cholesterolu. Nerovnováha může vést ke zvýšení hladin cirkulujícího cholesterolu a následnému ukládání v tkáních, zejména v endotelu cév. Hromadění cholesterolu v játrech je spojeno s IR. Vysoké hladiny inzulínu dysregulují jaterní jaderné receptory podílející se na biotransformaci cholesterolu. Výsledkem je zvýšená apoptóza hepatocytů, akumulace makrofágů a fibróza jater [6, 55, 56].

U jedinců s obezitou, IR nebo DM2T dochází ke zvýšení syntézy cholesterolu, zatímco jeho absorpce se snižuje. Zvýšená tvorba cholesterolu vyplývá z rostoucí syntézy lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL), která je způsobena nadměrným uvolňováním FA z inzulín rezistentních tukových buněk. Změna v syntéze nebo absorpci cholesterolu může mít vliv na účinnost inzulínu. Inhibitory syntézy cholesterolu statiny snižují hladiny TG a cholesterolu v plazmě a zároveň i zesilují účinek inzulínu. Redukce tělesné hmotnosti u obézních pacientů DM2T nejenže zlepší citlivost k inzulínu, ale vede také ke zvýšení absorpce cholesterolu [57, 58].

4.2 Transport lipidů

Lipidy jsou v plazmě transportovány v komplexu s proteiny. Lipoproteinové částice mají rozmanité složení, velikost, hustotu a místo původu. Skládají se obecně z hydrofobního lipidového jádra (TG, estery cholesterolu) a fosfolipidového obalu obsahující cholesterol a apolipoproteiny. Struktura lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) je zobrazena na Obrázku 6 [6].



Obrázek 6 Struktura lipoproteinové částice s vysokou hustotou. Převzato a upraveno z [13].

Apo C- apolipoprotein C, ApoA-I – apolipoprotein A-I, ApoA-II – apolipoprotein A-II,
ApoE – apolipoprotein E

Proteiny přítomné v lipoproteinových částicích se označují jako apolipoproteiny (Apo) a mají řadu funkcí. Jsou nutné pro sestavení, strukturu a sekreci lipoproteinu. Slouží také jako aktivátory důležitých enzymů v metabolismu lipoproteinu a jako rozpoznávací místa pro povrchové buněčné receptory. Hlavní Apo a jejich rozdělení je popsáno v Tabulce 5 [59].

Tabulka 5 Rozdělení apolipoproteinů. Převzato a upraveno z [14].

Apolipoprotein	Místo syntézy	Funkce
ApoA I	játra, střevo	strukturální
		aktivátor LCAT
ApoA II	játra	strukturální
ApoB 48	střevo	strukturální
ApoB 100	játra	strukturální
		ligand pro LDL receptor
ApoC II	játra	aktivátor LPL
ApoC III	játra	inhibitor LPL
ApoE	játra	ligand pro LDL receptor

LCAT – lecithin-cholesterol acyltransferáza, LPL – lipoproteinová lipáza, LDL – low density lipoprotein

Lipoproteiny se klasifikují nejčastěji podle hustoty a to do 5 skupin na: chylomikrony, VLDL, IDL (lipoproteiny se střední hustotou), LDL a HDL. Složení a velikost jednotlivých tříd lipoproteinů jsou zobrazeny v Tabulce 6 [59].

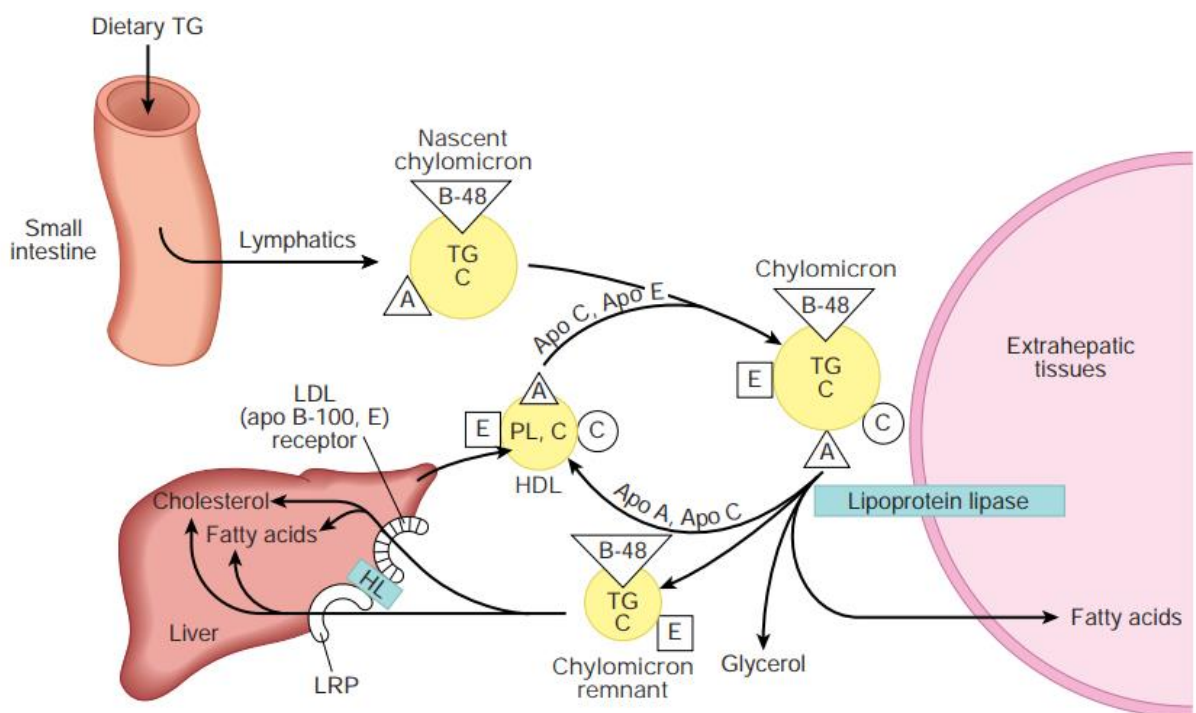
Tabulka 6 Rozdělení lipoproteinů. Převzato a upraveno z [15, 16].

Lipoprotein	Hustota (g.cm⁻³)	Charakteristické apolipoproteiny	Množství proteinů (%)	Hlavní lipid
Chylomikrony	<0,95	A-I, B-48, C-II, C-III, E	1-2	TG
VLDL	0,950 – 1,006	B-100, C-III, C-II, E	7-10	TG
IDL	1,006 – 1,019	B-100, C-III, E	10-12	TG
LDL	1,019 – 1,063	B-100	20-22	EC
HDL	1,063 – 1,210	A-I, A-II, C-III, E	44-55	PL

TG – triacylglyceroly, EC – estery cholesterolu, PL – fosfolipidy

4.2.1 Chylomikrony

Po jídle dochází v enterocytech k tvorbě chylomikronů, které mají nejmenší hustotu a největší velikost ze všech lipoproteinů. Jejich funkcí je transportovat lipidy ze stravy do periferních tkání. Vzniklé částice se vylučují do lymfatického systému a následně vstupují do krevního oběhu. V krvi chylomikrony přijímají od HDL nezbytné apolipoproteiny (ApoE, ApoC-II, ApoC-III). V kapilárách především tukové a svalové tkáně reagují chylomikrony s přítomnou LPL, která hydrolyzuje TG na FFA a glycerol. Pro aktivitu LPL je důležitá rovnováha mezi ApoC-II a ApoC-III, protože ApoC-III enzym inhibuje. Uvolněné FA mohou být použity jako zdroj energie, v tukových buňkách uloženy ve formě TG nebo jsou ve vazbě s albuminem transportovány do jater. Glycerol se dále využívá v játrech k syntéze řady látek. Chylomikrony se činností LPL postupně zmenšují. HDL předávají ApoC-II a ApoC-III. Zbytky chylomikronů jsou odstraněny z oběhu hepatocyty. Příjem zbytků chylomikronů zahrnuje vazbu na LDL receptor, LRP receptor (LDL-related receptor protein), jaterní lipázu (HL) a proteoglykany na povrchu buněk. Metabolismus chylomikronů je znázorněn na Obrázku 7 [6, 32, 59, 60].



Obrázek 7 Metabolismus chylomikronu. Převzato z [17].

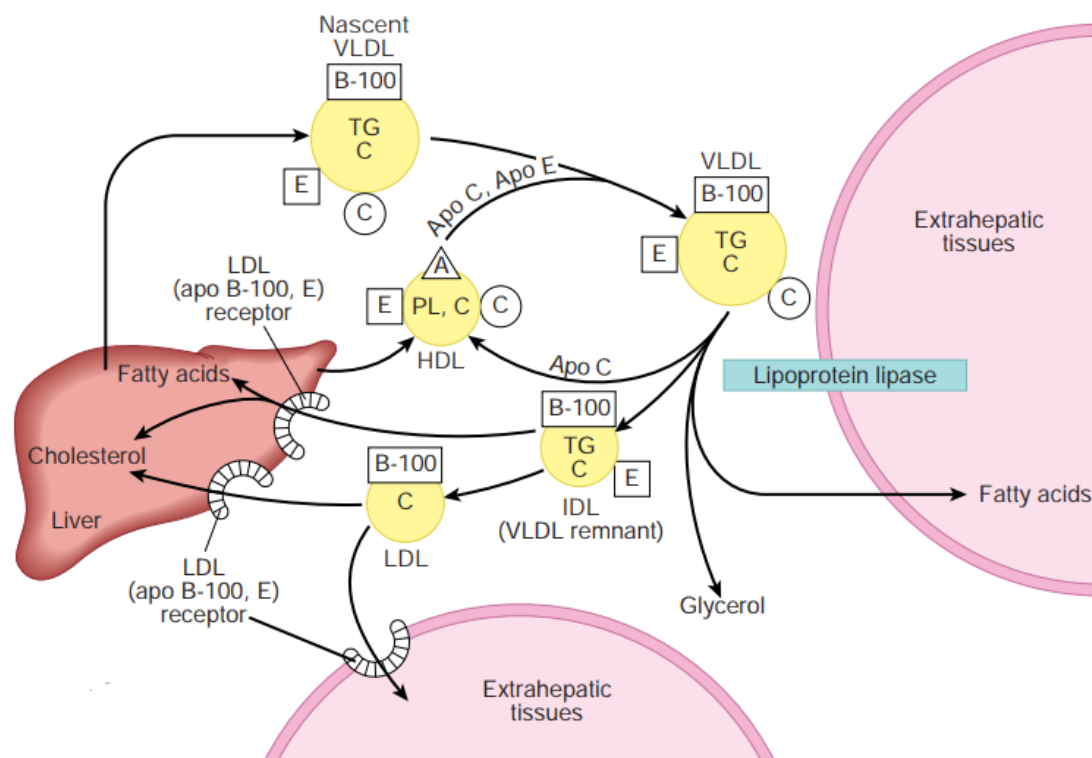
HDL – lipoprotein s vysokou hustotou; A, ApoA – apolipoprotein A; C, ApoC – apolipoprotein C; E, ApoE – apolipoprotein E; B-48 – apolipoprotein B-48; TG – triacylglycerol; C – cholesterol a estery cholesterolu; P – fosfolipidy; HL – jaterní lipáza; LRP – protein asociovaný s LDL receptorem

Při IR a DM2T vznikají v metabolismu chylomikronů změny. Zvýšená hladina cirkulujících lipidů po jídle je charakteristickým znakem dyslipidémie doprovázející IR. Vyšší produkce ApoB-48 ale nebyla u lidí prokázána. Diabetici 2. typu mají pomalejší odbourávání chylomikronů, protože nadměrný přísun FA do jater vyvolaný IR v periférii způsobuje zvýšenou sekreci VLDL. Chylomikrony soutěží s VLDL o lipolýzu zprostředkovanou LPL. Činnost LPL je regulována inzulínem na mnoha úrovních. Inzulín přímo ovlivňuje tvorbu apolipoproteinů v játrech. Rezistence na inzulín je spojena s nadprodukcí ApoC-III, který inhibuje LPL a vychytávání lipoproteinů prostřednictvím LRP receptoru. Také tvorba ApoB je v játrech při IR zvýšena. Pro odbourávání zbytků chylomikronů je důležitá HL a LDL receptory. Zvýšená hladina HL je přítomná u inzulín rezistentních stavů a přispívá k nízkým hladinám HDL. Genová exprese LDL receptorů je regulována inzulínem. Rezistence k inzulínu je spojena se snížením počtu těchto receptorů [60, 61].

4.2.2 Metabolismus VLDL

Tvorba VLDL částic probíhá v hepatocytech. Funkcí VLDL je přenášet TG z jater do periferních tkání. V krevním oběhu VLDL získávají od HDL důležité apolipoproteiny (ApoE a ApoC). Zároveň dochází mezi VLDL a HDL k přenosu lipidových složek prostřednictvím CETP (cholesterylester transfer protein). VLDL vyměňují TG za estery cholesterolu. Působením LPL jsou TG ve VLDL hydrolyzovány. Lipolýzou dochází k tvorbě menších částic s vyšší hustotou označovaných jako IDL. Prostřednictvím ApoE mohou být IDL přijímány játry nebo dále podléhají lipolýze za vzniku LDL. Hlavní funkcí LDL je přinášet cholesterol periferním tkáním, a to prostřednictvím ApoB-100, který rozpoznávají LDL receptory na povrchu buněk. Kompletní metabolismus VLDL je zobrazen na Obrázku 8 na straně 40 [6, 32, 60].

Sekrece VLDL závisí na dostupnosti TG v játrech. Zdrojem TG a složek pro jejich tvorbu jsou zbytky chylomikronů, FA vázané s albuminem a FA v játrech syntetizované *de novo*. IR v tukové tkáni způsobuje vyšší přísun FA do jater, které působí stimulačně na tvorbu TG. Zároveň je také snižena efektivita lipolýzy TG, protože při IR se zvyšuje sekrece ApoC-III a mírně snižuje aktivita LPL. Játra tak odstraňují zbytky chylomikronů s vyšším obsahem TG. Příjem nadbytečného množství TG a FA játra kompenzují vyšší sekrecí VLDL. Rovnováha mezi příjmem a výdejem lipidů je však brzy porušena a lipidy se začínají v játrech ukládat. Akumulace tuku v játrech vede ke vzniku jaterní steatózy. Jedná se o metabolické onemocnění, které se často vyskytuje společně s obezitou nebo DM2T [6, 60, 61].



Obrázek 8 Metabolismus VLDL. Převzato a upraveno z [17].

HDL – lipoprotein s vysokou hustotou; VLDL – lipoprotein s velmi nízkou hustotou, IDL – lipoprotein se střední hustotou, LDL – lipoprotein s nízkou hustotou, A, ApoA – apolipoprotein A; C, ApoC – apolipoprotein C; E, ApoE – apolipoprotein E; B-100 – apolipoprotein B-100; TG – triacylglycerol; C – cholesterol a estery cholesterolu; P – fosfolipidy

Zvýšená hladina VLDL v oběhu podporuje výměnu esterů cholesterolu a TG s HDL. Výsledkem je snížená hladina HDL a vyšší koncentrace LDL obohacených o estery cholesterolu. Tyto obohacené částice jsou dobrým substrátem pro HL nebo LPL. Hydrolýzou a následnou strukturální remodelací vznikají malé LDL s vyšší hustotou, které mají aterogenní vlastnosti. HDL s vyšším obsahem TG jsou hydrolyzovány lipázou, následně se odděluje ApoA a zbytek HDL částice se degraduje v tubulárních buňkách ledvin [32, 62].

Nárůst LDL a jejich modifikace jsou spojeny se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Malé LDL částice s vyšší hustotou, které se vyskytují u diabetiků 2. typu, jsou náchylnější k oxidaci než běžné LDL. Vlivem zvýšené glykémie po jídle může dojít také ke glykosilaci ApoB v LDL. Výsledkem je snížená afinita modifikovaných LDL k jaterní receptorům a zvýšená oxidace těchto částic. Modifikované LDL jsou vychytávány makrofágy prostřednictvím SR-A (scavenger receptor type A). Množství SR-A na povrchu není ovlivněno intracelulární koncentrací cholesterolu. Hromadění esterů cholesterolu uvnitř makrofágů

způsobuje jejich transformaci v pěnové buňky, které uvolňují významné cytokiny ($\text{TNF}\alpha$, IL-1) a mají klíčovou roli ve vzniku aterosklerotického plátu [6, 32, 63].

4.2.3 Metabolismus HDL

Tvorba HDL probíhá v játrech a střevě. Kompletní částice ale vznikají až v krevním oběhu přidáním ApoA a dalších lipidů. Hlavní funkcí HDL je transportovat přebytečný cholesterol z periferních tkání do jater. HDL vychytávají cholesterol z buněčných membrán a tím snižují jeho množství v buňce. Získaný cholesterol je ihned plazmatickým enzymem lecithin:cholesterolacyltransferáza (LCAT) esterifikován. LCAT přenáší acylový zbytek z druhého uhlíku fosfolipidu na 3-OH skupinu cholesterolu. Vzniklý ester je umístěn do středu HDL a transportován do jater. Během cesty HDL do jater dochází k přenosu části esterů cholesterolu na VLDL [6, 32].

HDL mají pozitivní vliv na β -buňky pankreatu, kde indukují silné antiapoptické signály. Snížení HDL je spojené s rezistencí na inzulin a je způsobeno především zvýšenou výměnou TG a esterů cholesterolu mezi HDL a VLDL. Nízké hladiny HDL jsou spojeny s vyšším rizikem vzniku řady onemocnění včetně DM2T [64].

5 ANALÝZA MASTNÝCH KYSELIN

Nejběžnější metodou používanou k analýze složení MK v biologických vzorcích je plynová chromatografie (GC). Příprava vzorku pro analýzu MK pomocí GC se obvykle skládá ze dvou samostatných kroků. Prvním krokem je extrakce lipidů pomocí organického rozpouštědla. Druhým je derivatizace MK na jejich těkavější sloučeniny, většinou na methylestery. Pro stanovení MK v jednotlivých lipidových frakcích se využívá tenkovrstvá chromatografie, která předchází derivatizaci [65].

5.1 Extrakce lipidů

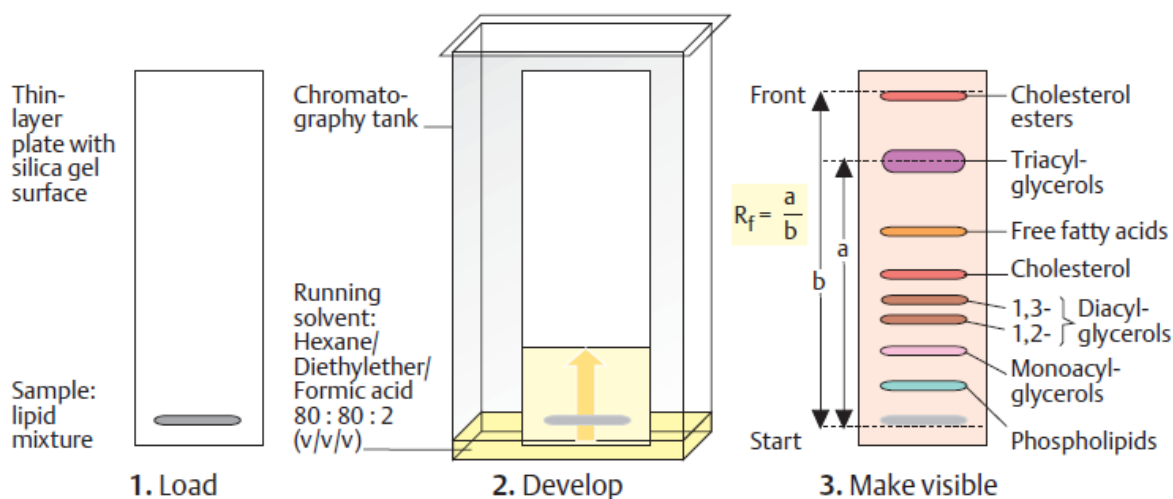
Pro analýzu MK je nutné nejprve oddělit lipidy od nežádoucích a rušivých látek ve vzorku, jako jsou proteiny, sacharidy, voda a další polární látky. V praxi se obvykle používá k extrakci lipidů systém dvou navzájem nemísitelných kapalin. Z vodného prostředí se lipidy extrahují do organického rozpouštědla (chloroform, benzen, toluen a další). Přičemž k rozdělení dochází na základě rozdílné rozpustnosti lipidů v těchto kapalinách [66, 67].

Účinnost extrakce organickým rozpouštědlem závisí na polaritě přítomných lipidů ve srovnání s polaritou rozpouštědla. Polární lipidy, jako jsou PL nebo glykolipidy, jsou rozpustnější v polárních rozpouštědlech (alkoholy) než v nepolárních (hexan). U nepolárních lipidů, jako jsou TG, je tomu naopak. K extrakci lipidů s širokým rozsahem polarity se často používá chloroform. Použití chloroformu je však spojeno s řadou problémů jako je složitější odebrání organické fáze, která je po dvoufázové separaci v dolní části zkumavky, nebo jeho karcinogenní vlastnosti. V současnosti se vyvíjejí a zlepšují metody bez použití chloroformu, které se navíc dají snadno automatizovat [66, 68].

5.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) patří mezi velmi rozšířené analytické metody, a to zejména díky své jednoduchosti, nízké ceně analýzy, nenáročnosti na přístrojové vybavení a snadnému vyhodnocení. Jedná se o separační metodu, která je založena na distribuci analytu mezi dvě fáze: stacionární a mobilní. Stacionární fáze se skládá ze skleněné, hliníkové nebo plastové desky, na kterou je nanášena vrstva sorbentu. Nejrozšířenějším sorbentem je silikagel. Dále se používá oxid hlinitý, celulóza nebo polyamid. Tloušťka sorbentu se může lišit podle účelu analýzy. V TLC se jako mobilní fáze uplatňují směsi rozpouštědel. Výběr vhodné mobilní fáze závisí na typu analytu. Pro rozdělení lipidů do jednotlivých tříd se obvykle používá směs

hexan-diethylether-kyselina mravenčí v poměru 80:20:2. Výsledek separace pomocí této mobilní fáze zobrazuje třetí část Obrázku 9 [69, 70].



Obrázek 9 Tenkovrstvá chromatografie. Převzato z [15].

Jednou z výhod TLC je jednoduchý postup. Analyzovaný vzorek se aplikuje na TLC desku ve vhodném rozpouštědle jako malá skvrna nebo úzký proužek (viz Obrázek 9, první část). Vhodné rozpouštědlo je těkavé a má malou viskozitu. Vzorky mohou být na desku nanášeny manuálně nebo pomocí automatického dávkovače. V obou případech však nesmí dojít k poškození povrchu sorbentu. Po odpaření rozpouštědla se deska umístí do chromatografické vany, která je nasycena parami mobilní fáze. Většina separací využívá vzestupné vyvíjení (viz Obrázek 9, druhá část). Mobilní fáze se pomocí kapilárních sil pohybuje směrem vzhůru a různou rychlostí s sebou unáší jednotlivé složky vzorku. Rychlost pohybu složek je dána jejich rozdělením mezi stacionární a mobilní fázi. Mezi další techniky separace patří vyvíjení sestupné, radiální nebo dvourozměrné. Jakmile mobilní fáze dosáhne čela desky, je analýza ukončena [43, 69, 71].

K vizualizaci jednotlivých složek, pokud nejsou barevné, se používá vhodné činidlo (dichroman draselný, páry jódu, fluorescein a další), které se na TLC desku aplikuje nejčastěji postříkáním. K identifikaci jednotlivých složek vzorku slouží retenční faktor R_F . Jeho hodnota je definována jako podíl vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti čela od startu. Pro kvantitativní stanovení jednotlivých složek se používají nejčastěji skenovací denzitometry. Další možností je nepřímá kvantifikace, kdy se úsek skvrny z desky vyškrábe, extrahuje vhodným rozpouštědlem a koncentrace látky se stanoví vhodnou instrumentační metodou. Tento postup je však časově náročnější [69, 70, 71].

5.3 Derivatizace

Přímé stanovení FA pomocí GC je obtížné zejména díky vysoké polaritě a nízké těkavosti FA. Derivatizací se zvýší těkavosti, dojde k lepšímu oddělení a zkrácení doby analýzy. Existuje několik derivatizačních postupů, většina je však založena na konverzi FA na methylestery. Protože lipidy se převážně vyskytují jako směs esterů, příprava methylesterů mastných kyselin (FAME) spočívá v transesterifikaci. Hydrolyza a esterifikace probíhají v jednom kroku. Tvorba FAME esterifikací probíhá v přítomnosti alkalického nebo kyselého katalyzátoru. Reakce katalyzované alkalickými činidly probíhají rychleji a za laboratorních teplotních podmínek. Běžně používané alkalické katalyzátory jsou methoxid sodný, hydroxid sodný a hydroxid draselný. Alkalické katalyzátory však nemohou esterifikovat FFA. Reakce zahrnující kyselé katalyzátory vyžadují pro urychlení procesu vyšší teplotu, ale mohou esterifikovat i FFA. Mezi používané kyselé katalyzátory patří kyselina chlorovodíková, kyselina sírová a fluorid boritý. Rychlost reakce závisí nejen na povaze katalyzátoru, ale také na reakčních podmínkách a rozpustnosti lipidového vzorku v methanolu [72, 73, 74].

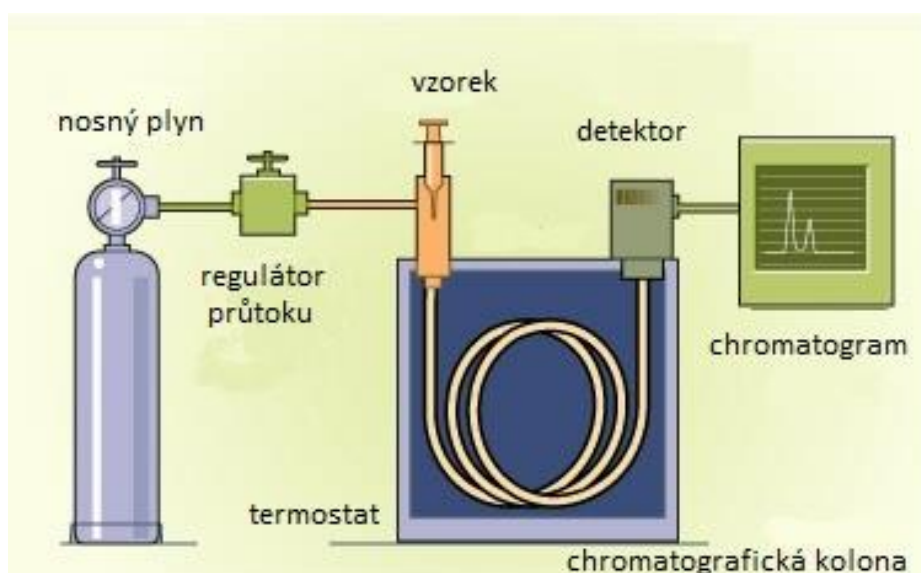
Příprava FAME je však spojena s řadou problémů. Jedním z nich je neúplná konverze lipidů na methylestery nebo ztráta vysoce těkavých FAME s krátkým řetězcem. U vzorků obsahujících MK s krátkým řetězcem se proto doporučuje příprava stabilnějších butylesterů. Častým problémem je také tvorba artefaktů, které mohou být nesprávně identifikovány jako FAME nebo překrývat vrcholy FAME v GC analýze. Při nesprávně optimalizované esterifikaci dochází ke kontaminaci, která obvykle vede k poškození kolony plynového chromatografu [74].

5.4 Plynová chromatografie

Převedení FA na jejich těkavější deriváty umožňuje analyzovat vzorky pomocí GC. Jedná se o separační metodu, při které dochází k rozdělení vzorku v plynném skupenství mezi fází stacionární a mobilní. Mobilní fáze, označovaná v GC jako nosný plyn, slouží k transportu vzorku na kolonu. Mezi nejčastěji používané plyny patří dusík, vodík, helium nebo argon. Výběr nosného plynu závisí na požadovaných vlastnostech (cena, bezpečnost práce, čistota, inertnost) nebo typu použitého detektoru. V koloně umístěná stacionární fáze může být pevná látka (povrchově aktivní adsorbent) nebo kapalina ukotvená na nosiči. Kolony používané v GC jsou náplňové nebo kapilární. Pro vyšší účinnost separace se častěji používají kolony kapilární. Schéma plynového chromatografu znázorňuje Obrázek 10 na straně 45 [67, 71, 75].

Vzorek se aplikuje v plynném nebo kapalném skupenství do proudu mobilní fáze. Pokud je kapalný, je velmi rychle odpařen. Nosný plyn transportuje vzorek do kolony, kde dochází

k separaci vzorku na jednotlivé složky. Některé složky se poutají ke stacionární fázi v koloně déle, jiné se téměř nezadržují. Jak jednotlivé složky postupně opouštějí kolonu, zachycuje detektor. Nejčastěji se k detekci používá detektor tepelně-vodivostní, detektor plamenově ionizační, hmotnostní detektor nebo detektor elektronového záchytu. Tepelně-vodivostní detektor se řadí k nejdéle používaným. Jeho hlavní výhodou je univerzální použití. Má však ale nižší citlivost. Detektor elektronového záchytu je selektivní, vyznačuje se vysokou citlivostí na halogenové sloučeniny. K analýze FA se v praxi obvykle používá detektor plamenově ionizační, který je velmi citlivý a má dobrou linearitu v širokém rozsahu koncentrací analytu. Jeho nevýhodou pro stanovení FAME je nedostatečná selektivita u komplikovaných vzorků, které vede k chybné identifikaci. V současnosti je proto plamenově-ionizační detektor nahrazován hmotnostní detekcí. Hlavní výhodou hmotnostní detekce je citlivost a selektivita [67, 70, 71, 74, 76].



Obrázek 10 Schéma plynového chromatografu. Převzato a upraveno z [18].

GC umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Aplikace GC v praxi je rozmanitá. GC se uplatňuje v klinické biochemii, analýze životního prostředí, potravin, kosmetických přípravků nebo produktů ropy [67].

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- **Třepačka Vortex typ REAX top**
Výrobce: Heidolph instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Strasse 12, 911 26 Schwabach, Německo
- **Centrifuga typ MPW-340**
Výrobce: Mechanyka Precyzna, Polsko
Distributor: Servis Unimed, Vestec 41, 252 Vestes u Prahy, ČR
- **Odpařovací zařízení Pierce model 18780, Reactive-Vap Evaporating Unit**
Výrobce: Thermoscientific, 28 Schenck Parkway, Asheville Severní Karolína 28803, USA
- **Chromatografické desky**
Parametry: TLC Silica gel 60, 25 Glass plates 20 x 20 cm, balení 25 kusů, číslo produktu 1.05721.0001
Výrobce: Merck spol. s.r.o., Na Hřebenech II 1718/10, 140 00 Praha 4
- **Rozprašovací sprej, Desaga spray gun, Dünnschicht-chromatographie, Thin-layer**
Výrobce: Desaga, Gmbh D-690 Heidelberg 1, Německo
- **Termoblok Pierce Reacti-Therm Heating/Stirring Module 18821**
Výrobce: Thermoscientific, 28 Schenck Parkway, Asheville Severní Karolína 28803, USA
- **Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A GC Systém**
Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- **Kolona HP-88**
Parametry: 100 m x 0,250 mm x 0,20 μm , teplotní limit od 50°C do 250°C pro dělení methylesterů mastných kyselin
Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- **UV 240 lampa**
Výrobce: A. Krüss Optronik GmbH, Darmstadt, Německo
- **Chromatografická vana**
- **Pipety:** automatické 100, 250, 500 a 1000 μl , a skleněné 1, 5 a 10 ml; pipetovací balónek, špičky

- **Pyrexové zkumavky**
Parametry: typ 1636/26MP, 761152 Culture Tube 16x100 SVL SCRE s teflonovým těsněním
Výrobce: Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Spojené království
- **Chromatografické vialky s pryžovým septem pro GC a inserty**
Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- **Odměrné válce:** 50 a 250 ml
- **Pasteurovy pipety**
- **Špachtle**
- **Magnetická míchadla**
- **Skleněné zkumavky**
- **Odměrné baňky:** 100, 250 a 500 ml
- **Mikrozkumavky Eppendorf**

6.2 Chemikálie

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

- Isopropylalkohol, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8%, Mr = 60,1 g/mol, hustota 780 kg/m³, číslo šarže: PP/2015/12107
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- n-heptan, čistý, balení 1000 ml, Mr = 100,21 g/mol, hustota 680 kg/m³, číslo šarže: PP/2010/14672
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Kyselina fosforečná, p.a., balení 1000 ml, obsah 85%, Mr = 98 g/mol, hustota 1700 kg/m³, číslo šarže: 1801230113
Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

Mobilní fáze pro TLC (hexan:diethylether:kyselina octová)

- n-hexan, p.a., balení 1000 ml, obsah 99%, Mr = 86,18 g/mol, hustota 660 kg/m³, číslo šarže: PP/2014/05928
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Diethylether, p.a., nestabilizovaný, balení 1000 ml, obsah 99,7%, Mr = 74,12 g/mol, hustota 714 kg/m³, číslo šarže: 2203060317
Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

- Kyselina octová, čistá, balení 1000 ml, obsah 99%, Mr = 60,05 g/mol, hustota 1050 kg/m³, číslo šarže: 1907280714
Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

Detekční činidlo

- 2',7'-dichlorfluorescein, 90%, pro TLC, Mr = 401,2 g/mol, číslo šarže: 319108554
Výrobce: Carl Roth GmbH + Co.KG, 76185 Karlsruhe, Německo

Standard pro stanovení mastných kyselin

- 37 methylesterů mastných kyselin různých koncentrací v dichlormethanu, číslo šarže: CRM47885
Výrobce: Sulpeco, Solutions within, North Harrison Road 595, Bellefonte, USA

Interní standard

- Kyselina heneikosanová (C21:0)
Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo

Ostatní chemikálie

- Acetylchlorid, Reagent Plus > 99%, balení 500 ml, číslo šarže: STBD5754V
Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo
- Methylalkohol, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8%, Mr = 32,04 g/mol, hustota 791 kg/m³, číslo šarže: 2209270917
Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
- Toluen, p.a., balení 1000 ml, obsah 99%, Mr = 138,21 g/mol, hustota 867 kg/m³, číslo šarže: PP/2017/09776
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Uhličitan draselný, bezvodý, balení 500g, Mr = 138, 21 g/mol, číslo šarže: PP/2013/12622
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Chloroform, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8%, Mr = 119,38 g/mol, hustota 1483 kg/m³, číslo šarže: 1611101111
Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

- Dichlormethan, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,5%, Mr = 84,93 g/mol, hustota 1330 kg/m³, číslo šarže: 2207100717
Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
- Standard pro TLC: pool plazma

Tlakové lahve

- 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

6.3 Postup práce

6.3.1 Analyzované vzorky

V rámci této diplomové práce bylo analyzováno celkem 18 anonymních vzorků plazmy pacientů s DM2T a 17 vzorků plazmy zdravých dárců. Vzorky diabetiků i zdravých dárců byly získány z Univerzity Tübingen. Biochemické parametry získaných vzorků jsou uvedeny pro diabetiky v Tabulce 7 a pro zdravé dárce v Tabulce 8.

Žilní krev byla odebírána do speciálních zkumavek pro diagnostiku diabetu s antiglykolitickým činidlem fluoridem sodným a s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Centrifugací získána plazma byla uchována při teplotě -20°C a transportována na Katedru biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, kde byla dále zpracována postupem pro analýzu MK pomocí GC.

6.3.2 Denaturace bílkovin a extrakce lipidů

Do skleněných zkumavek bylo pipetováno 500 µl vzorku nebo standardu pro TLC (pool plazma). Následně bylo přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku o složení: 2-propanol, n-heptan a 2M H₃PO₄ v poměru 40:20:1. Vzniklá směs bylo promíchána na vortexu a deset minut kondicionována při pokojové teplotě. Poté byl přidán 1 ml směsi toluen:methanol v poměru 4:1 a 1,5 ml destilované vody. Dále následovala desetiminutová centrifugace při 3000 otáčkách

za minutu. Horní organická vrstva (supernatant) byla přepipetována do čisté skleněné zkumavky a odpařena pod dusíkem při pokojové teplotě do sucha.

6.3.3 Tenkovrstvá chromatografie

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla vytvořena smísením 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml 99% kyseliny octové v chromatografické vaně. Před vložením chromatografické desky byla vana na 40 minut uzavřena, aby došlo k jejímu nasycení parami mobilní fáze.

Příprava chromatografické desky

Na chromatografickou desku byly tužkou vyznačeny: boční okraje 1 cm od hrany desky, čelo ve vzdálenosti 1 cm od horního okraje a startovací linie 2,5 cm od spodní hrany. Prostor mezi bočními okraji byl rozdělen na šest drah, každá o šířce 3 cm. Přičemž pět drah bylo určeno pro vzorky, šestá pro TLC standard.

Vlastní tenkovrstvá chromatografie

Odparky pěti vzorků a standardu byly rozpuštěny v 75 μ l směsi chloroform:methanol v poměru 2:1, promíchány na vortexu a pomocí Pasteurových pipet naneseny na startovací linii chromatografické desky, tak aby nedošlo k poškození jejího povrchu. Poté bylo do zkumavky přidáno dalších 25 μ l směsi chloroform:methanol v poměru 2:1 a obsah zkumavek byl stejným způsobem kvantitativně převeden na chromatografickou desku. Po odpaření rozpouštědla byla deska vložena do chromatografické vany, kde byla ponechána přibližně hodinu, do doby než mobilní fáze dosáhla vyznačeného čela desky. Poté byla deska vyjmuta z vany a vysušena v digestoři.

Detekce jednotlivých tříd lipidů

Pro detekci jednotlivých tříd lipidů slouží dráha s pool plazmou. Na tuto dráhu bylo rovnoměrně aplikováno detekční činidlo 2',7'-dichlorfluorescein. Ostatní část desky byly zakryté. Po zaschnutí detekčního činidla bylo pomocí UV-lampy rozlišeno šest lipidových frakcí: fosfolipidy, diacylglyceroly, cholesterol, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu. Tužkou byly jednotlivé frakce vyznačeny a to tak, že nad horním i dolním okrajem byl ponechán 0,5 cm prostor.

Izolace jednotlivých tříd lipidů

Podle vyznačených frakcí ve standardu byly tužkou označeny i frakce v ostatních drahách. Takto vyznačená pole byla pomocí špachtle z chromatografické desky vyškrábána

a převedena do předem připravených pyrexových zkumavek s teflonovým těsněním. S výjimkou frakce cholesterolu, který se k další analýze nepoužívá.

6.3.4 Derivatizace mastných kyselin

Do pyrexových zkumavek s jednotlivými frakcemi byl přidán 1 ml interního standardu pro plynovou chromatografii o koncentraci 10 µg/ml (kyselina heneikosanová) 1 ml směsi toluen:methanol v poměru 4:1. Následně bylo vloženo magnetické míchadlo a přidáno 200 µl acetylchloridu, který má funkci katalyzátoru esterifikace. Pyrexové zkumavky uzavřené víčkem s teflonovým těsněním bylo vloženy na 1 hodinu do termobloku vyhřátého na teplotu 100°C a se zapnutým mícháním na rychlost 8.

Po uplynutí reakční doby, byly zkumavky z termobloku vyndány a stáním v digestoři ochlazeny na pokojovou teplotu. Poté byla přidáním 5 ml 6% roztoku K₂CO₃ provedena neutralizace. Po přidání uhličitanu byla směs 2 minuty intenzivně v ruce třepána a následně byla centrifugována 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. Horní organická vrstva byla přepipetována do čistých zkumavek a za laboratorní teploty odpařena dusíkem do sucha.

K odparkům methylesterů bylo následně přidáno 100 µl dichlormethanu a vzniklý roztok byl převeden do označených chromatografických vialek a uzavřen víčkem s pryžovým septem.

6.3.5 Plynová chromatografie

Připravené vzorky v uzavřených vialkách byly vloženy do karuselu plynového chromatografu. Následně byl zapnut plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s HP kolonou pro dělení methylesterů a puštěny plyny. V počítačovém programu spojeném s plynovým chromatografem byly nastaveny podmínky měření. Nastavený teplotní program byl následující:

- teplota nástřiku 230°C
- počáteční teplota na koloně 130°C po dobu 1 minutu s následným teplotním gradientem:
 - zvýšení o 2°C za minutu od teploty 130°C až do 176°C po dobu 2 minut
 - zvýšení o 1°C za minutu od teploty 176°C až do teploty 186°C po dobu 1 minuty
 - zvýšení o 0,2°C za minutu od teploty 186°C až do 190°C po dobu 1 minuty
 - zvýšení o 1°C za minutu od teploty 190°C až do 220°C po dobu 4 minut
- teplota detekce na plamenově ionizačním detektoru 250°C

Celkový čas analýzy jednoho vzorku byl 92 minut. Vzorky byly měřeny v módu split v poměru 10:1 s dávkovaným objemem 1 µl.

6.3.6 Vyhodnocení výsledků

K identifikaci jednotlivých mastných kyselin byly použity retenční časy získané ze záznamu standardu s daným obsahem jednotlivých mastných kyselin. Získané chromatogramy byly integrovány v programu GC ChemStation B.04.03. Koncentrace MK byla vypočítána pomocí jednobodové externí kalibrace s použitím response faktorů (IRF) podle vztahu:

$$IRF = \frac{A_{IS} \times C_{MK-st}}{C_{IS-st} \times A_{MK-st}} \quad C_{MK-vz} = \frac{C_{IS-vz} \times A_{MK-vz} \times IRF}{A_{IS-vz}}$$

A – plocha, C – koncentrace, IS – interní standard (C21:0), st – standard, vz – vzorek

Takto získaná data byla dále statisticky zpracována pomocí softwaru Microsoft Excel 2016 a Statistica 12.

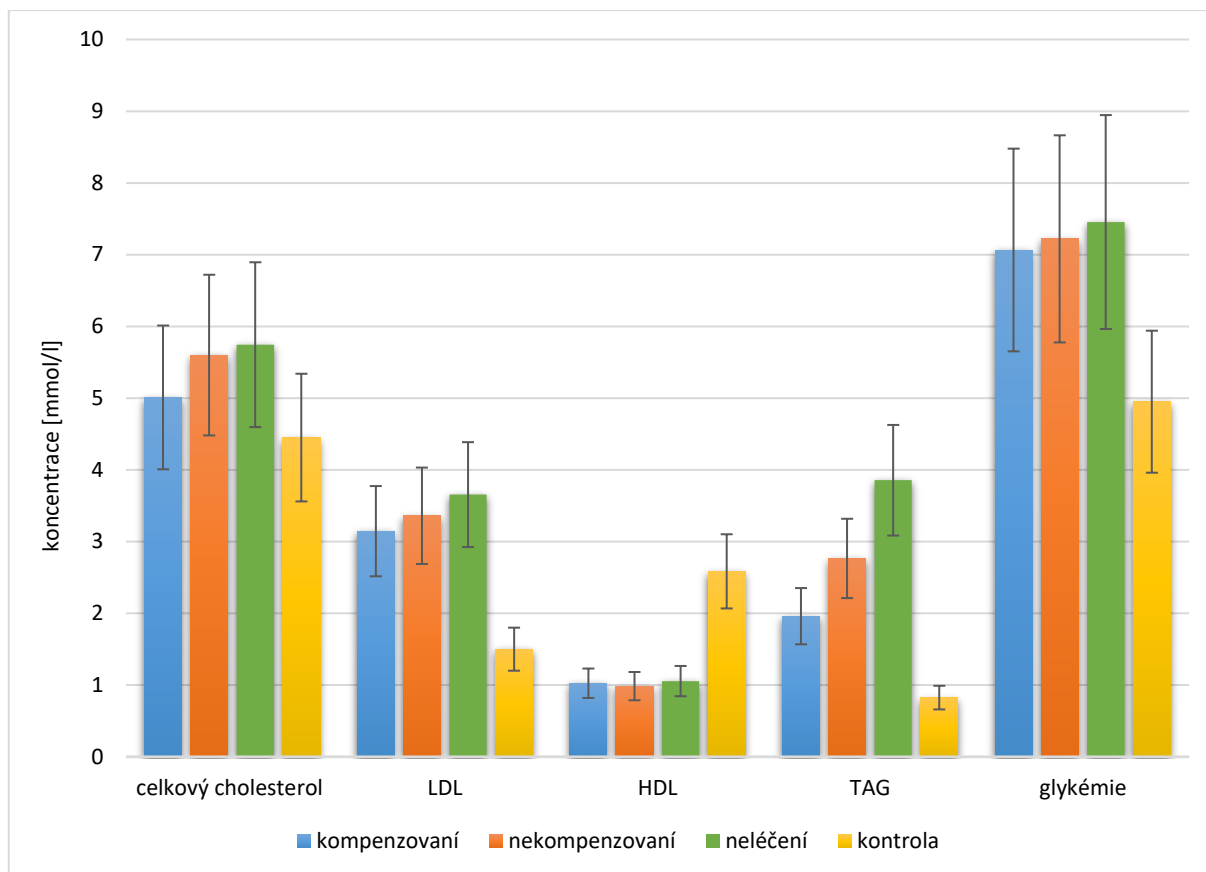
7 VÝSLEDKY

7.1 Soubor pacientů

K analýze bylo použito celkem 18 vzorků plazmy od pacientů s DM2T a 17 vzorků plazmy od zdravých dárců (kontrolní skupina). Ze získaných vzorků diabetiků jsou pouze dva pacienti dosud neléčeni. Ostatní pacienti užívají perorální antidiabetikum metformin v různých denních dávkách, s výjimkou jednoho pacienta, který užívá derivát sulfonylurey glyclada v denní dávce 30 mg. Pro přesnější interpretaci výsledků byli pacienti rozděleni na diabetiky léčené a neléčené. Diabetici užívající metformin byli ještě podle hodnoty glykovaného hemoglobinu rozděleni do dvou skupin a to na kompenzované ($HbA_{1c} < 5,9 \%$) a nekompenzované ($HbA_{1c} > 5,9 \%$). Klinicko-biochemické hodnoty těchto pacientů jsou uvedeny v Tabulce 7 a v Grafu 1.

Tabulka 7 Biochemické parametry vzorků diabetiků

číslo vzorku	pohlaví (M/F)	glykémie (mmol/l)	HbA _{1c} (%)	celkový chol (mmol/l)	LDL (mmol/l)	HDL (mmol/l)	TAG (mmol/l)	metformin (mg/den)
1	M	6,81	3,9	5,36	3,38	1,39	1	0
2	M	7,23	6,1	5,99	3,42	0,98	2,72	1000
3	M	9,3	6,7	5,21	3,24	0,99	2,81	3000
4	M	6,91	4,3	6,1	3,59	1,03	1,92	1700
5	F	7,06	4	5,03	3,68	0,99	1,38	2000
6	F	5,8	4,7	3,14	1,53	1,3	1,32	1700
7	F	6,39	4,3	3,72	2,16	1,02	1,47	750
8	F	5,72	4,5	4,9	3,08	1,21	2,01	500
9	M	7,21	5,9	6,23	4,01	1,11	2,61	2000
10	M	7,28	5,1	5,18	3,43	0,87	2,94	1000
11	F	7,91	5,6	4,27	2,16	0,89	3,42	750
12	F	8	5,8	5,23	1,98	1,04	3,13	2000
13	F	9,88	4,7	4,99	2,68	1,67	1,61	1700
14	F	6,2	5	4,86	3,21	0,93	2,72	500
15	M	4,83	8	4,3	3,3	0,87	4,9	2000
16	M	7,07	5,1	5,18	3,24	1,13	2	glycada
17	M	7,12	5,3	5,68	3,81	0,95	1,63	1700
18	M	8,1	6,1	6,13	3,93	0,72	6,71	0



Graf 1 Koncentrace biochemických parametrů u jednotlivých skupin

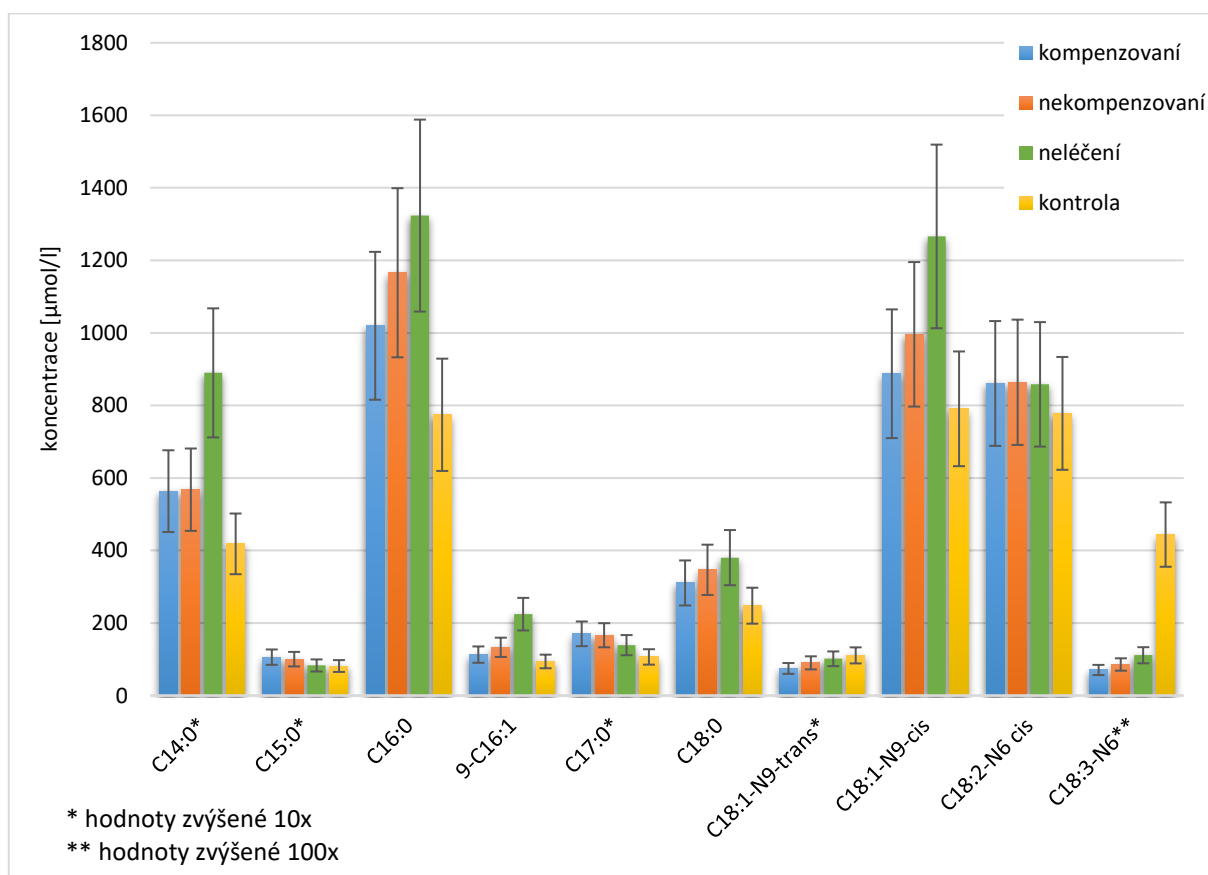
K léčbě diabetu 2. typu se primárně používá metformin. Dosavadní výsledky léčby metforminem jsou velmi významné a pro studium jeho účinků je nutné zjistit jeho vliv na dyslipidémii, která je velmi častým negativním projevem onemocněním DM2T. Dyslipidémie se projevuje zvýšením hladiny TAG, celkového a LDL cholesterolu a snížením hladiny HDL cholesterolu. Z biochemických výsledků studovaných pacientů (viz Tabulka 7) je zřejmé, že vlivem metforminu jsou tyto charakteristiky upraveny do přijatelných fyziologických rozmezí s výjimkou pacientů č. 4, 9 a 17, kteří mají zvýšené hodnoty celkového a LDL cholesterolu a pacientů č. 10, 11 a 15, kteří mají hodnoty TAG a HDL cholesterolu mimo fyziologické rozmezí. Proto jsme se v další interpretaci výsledků zaměřili na tyto pacienty.

7.2 Vyhodnocení dat

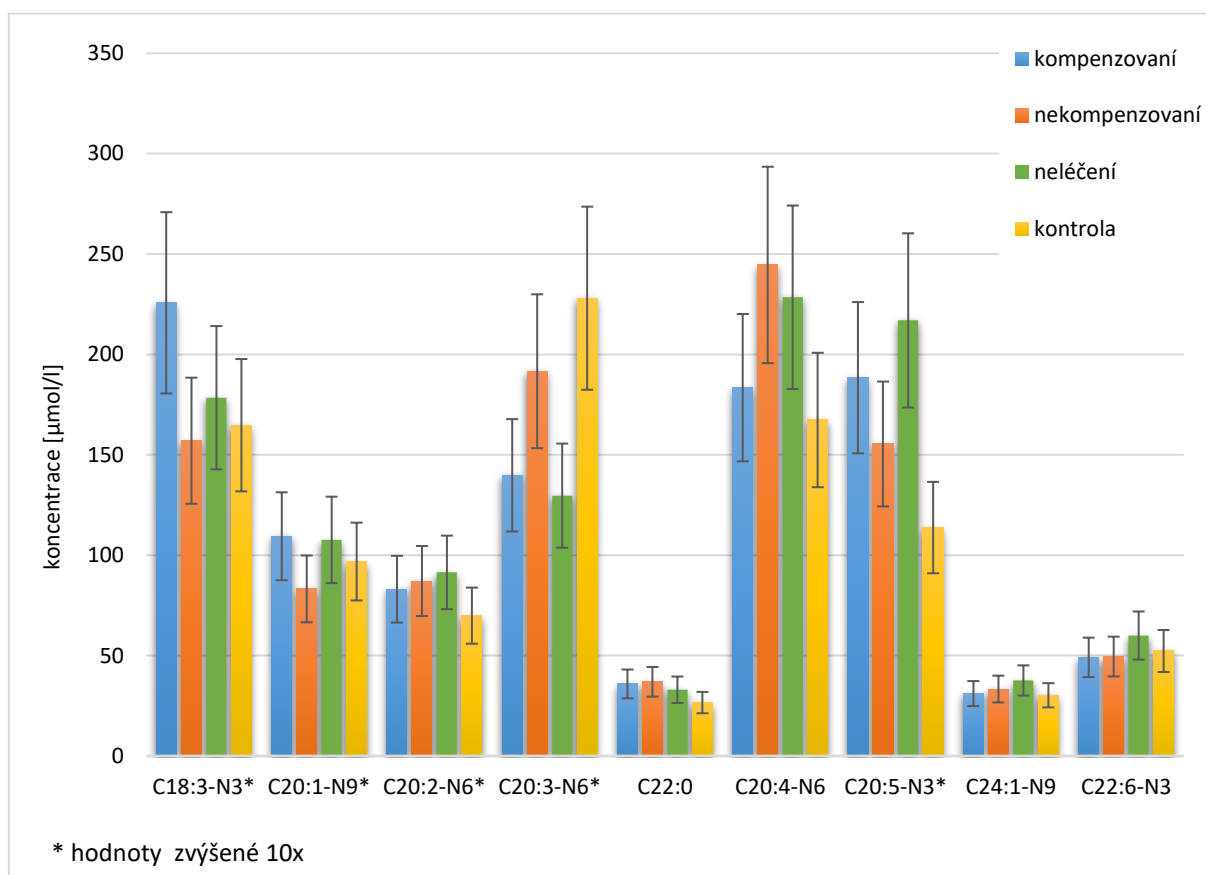
Získané hodnoty koncentrací MK (Tabulky 13–17) byly statisticky zpracovány v programech MS Excel a Statistika 12. V programu Microsoft Excel 2016 byly vytvořeny sloupcové grafy zobrazující průměrnou koncentraci MK v plazmě u vybraných skupin pacientů a zdravých dárců a aktivitní indexy enzymů v plazmě. Bodové grafy byly vytvořeny v programu Statistika 12. V tomto programu byl také proveden Spearmanův korelační test pro zjištění významných korelací obsahu MK s glykovaným hemoglobinem.

Před provedením analýzy vlastních vzorků byla nejprve ověřena přesnost metody stanovení MK analýzou použitím deseti vzorků pool plazmy, které byly zpracovány stejným způsobem jako analyzované vzorky diabetiků a zdravých dárců. Ze získaných dat byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV). Výsledky stanovení přesnosti metody jsou uvedeny v příloze (Tabulka 9).

7.3 Zastoupení mastných kyselin



Graf 2 Zastoupení vybraných mastných kyselin v plazmě u jednotlivých skupin pacientů

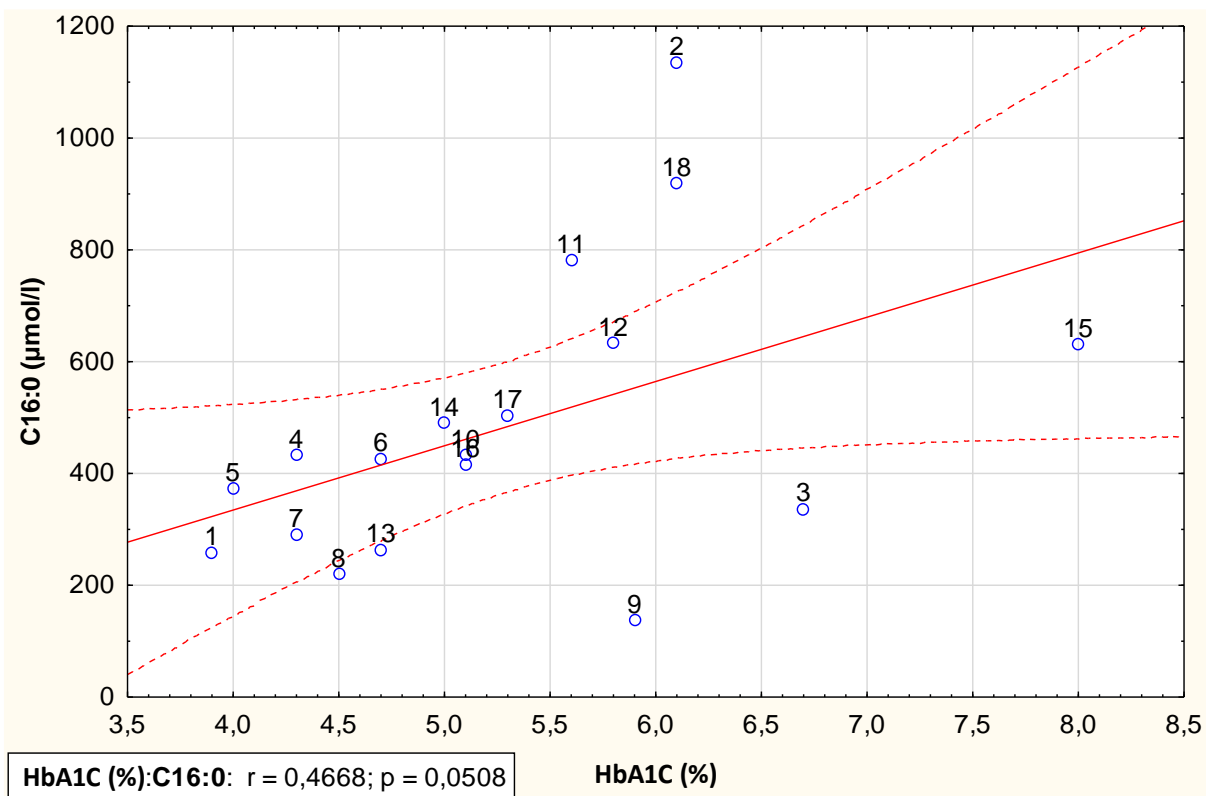


Graf 3 Zastoupení vybraných mastných kyselin v plazmě u jednotlivých skupin pacientů

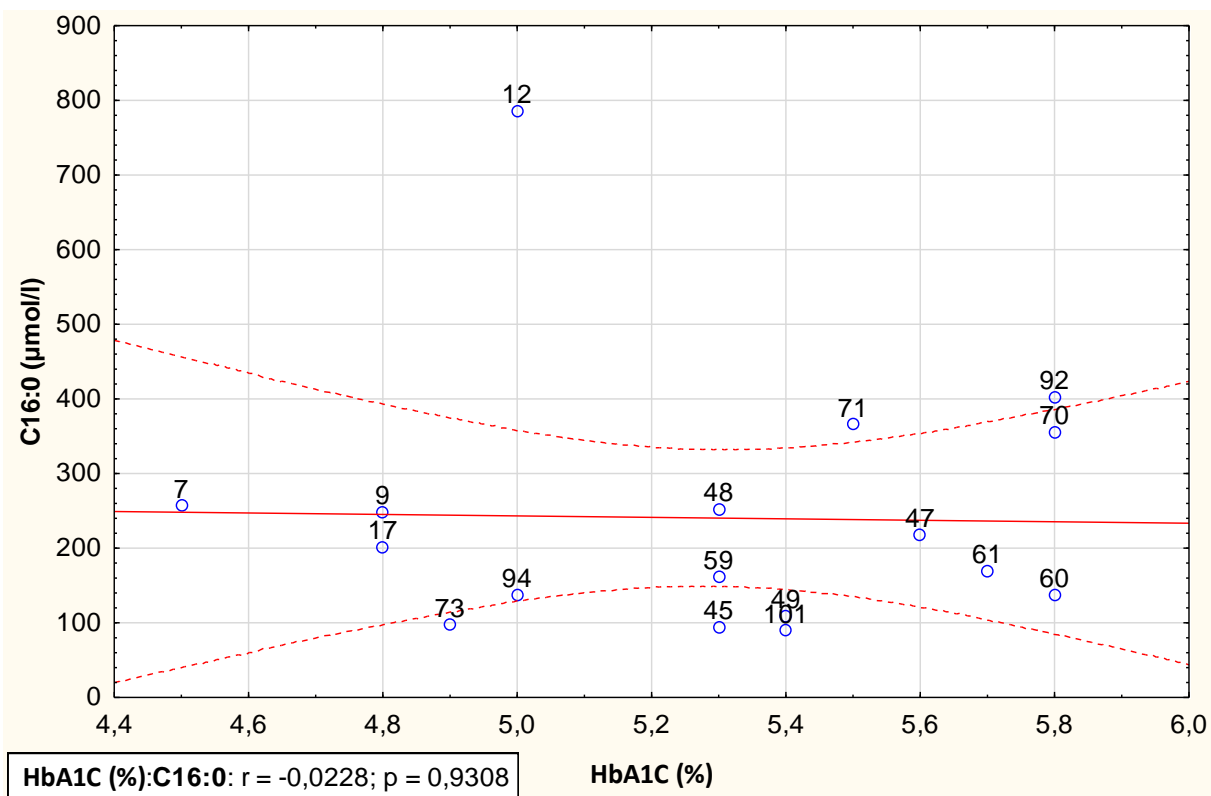
7.4 Glykovaný hemoglobin

Glykovaný hemoglobin je hlavním biologickým markerem úspěšnosti léčby diabetu typu 2. Závislost obsahu MK na glykovaném hemoglobinu není u sledovaných diabetiků příliš významná, protože léčba metforminem vyrovnává hodnoty glykovaného hemoglobinu do fyziologického rozmezí. Přesto byly nalezeny statisticky významné závislosti obsahu MK na koncentraci glykovaného hemoglobinu ve frakci TG a FFA. Pro porovnání jsou ke každému grafu přiřazeny grafy s hodnotami zdravých dárců pro sledovanou MK.

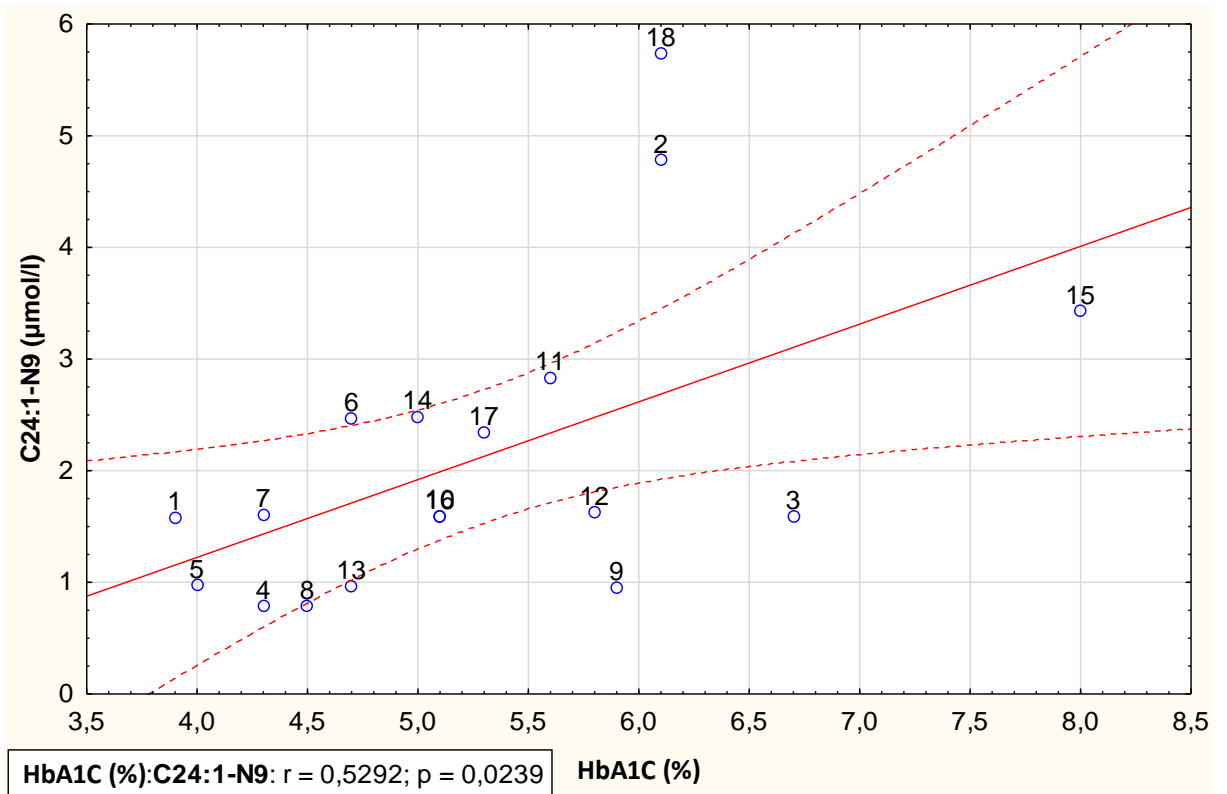
Dále byly graficky zpracovány aktivní indexy enzymů Δ^9 -desaturázy, Δ^5 -desaturázy a elongázy v plazmě (Graf 14). Aktivní indexy enzymů jsou určeny vztahem produkt/ substrát. Pro výpočet Δ^9 -desaturázy byl použit poměr C18:1/C18:0, pro Δ^5 -desaturázu C20:4-N6/C20:3-N6 a pro elongázu C18:0/C16:0. Výsledné aktivní indexy enzymů v jednotlivých frakcích pro pacienty s DM2T a zdravé dárce jsou v příloze (Tabulka 10 a 11). společně s porovnáním aktivit enzymů pomocí T-testu (Tabulka 12). Červeně jsou zvýrazněny hodnoty s hladinou významnosti $p < 0,05$.



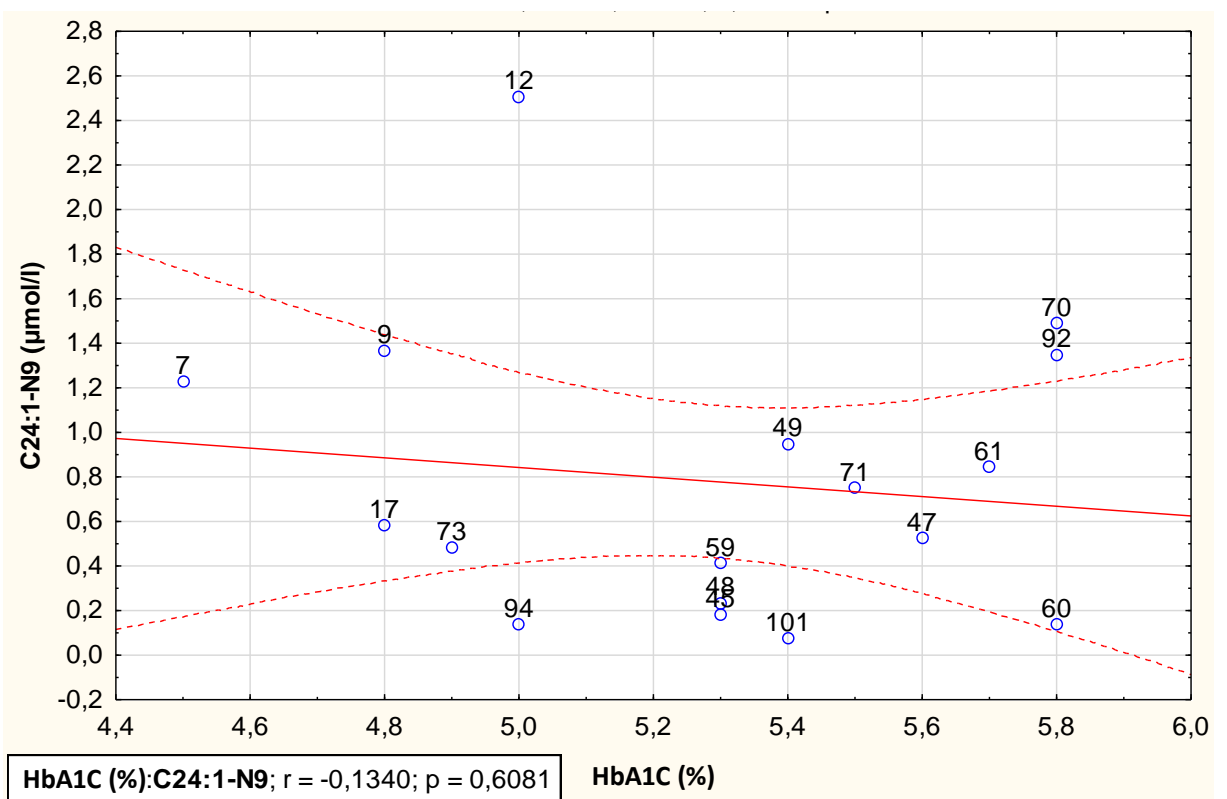
Graf 4 Závislost kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků



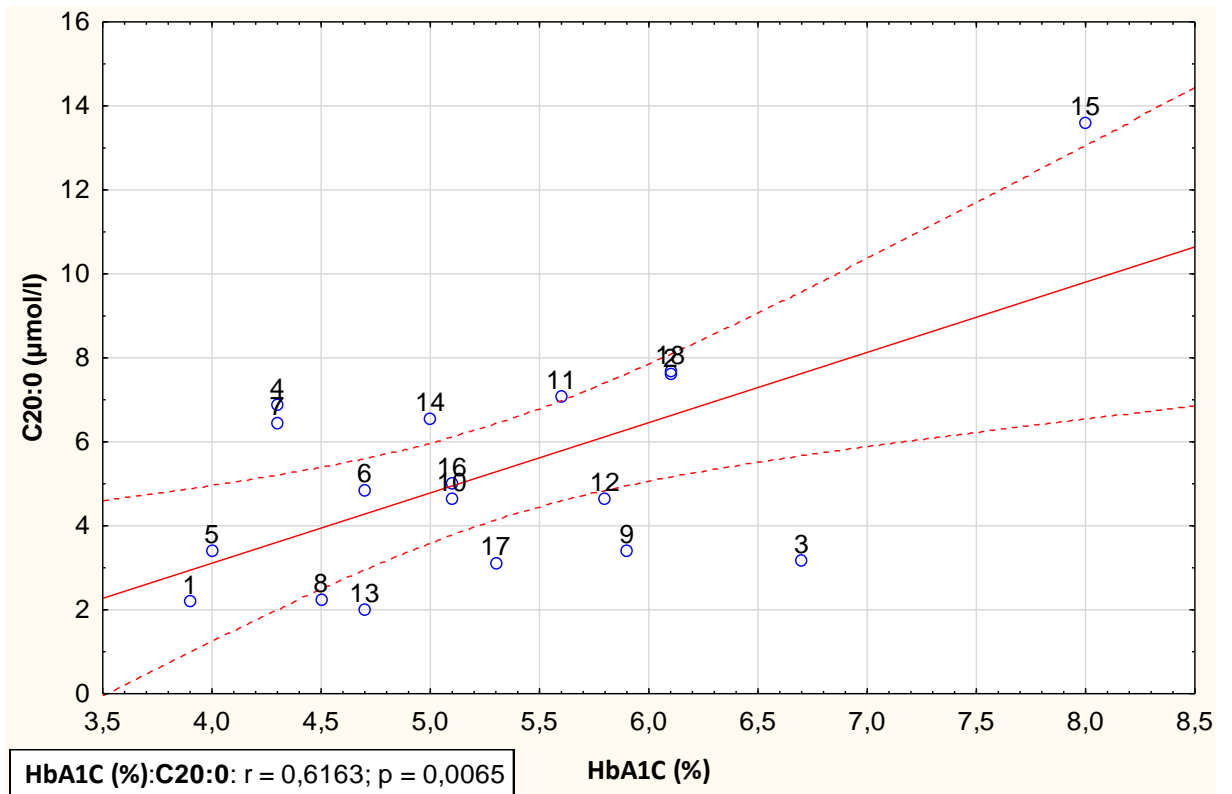
Graf 5 Závislost kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců



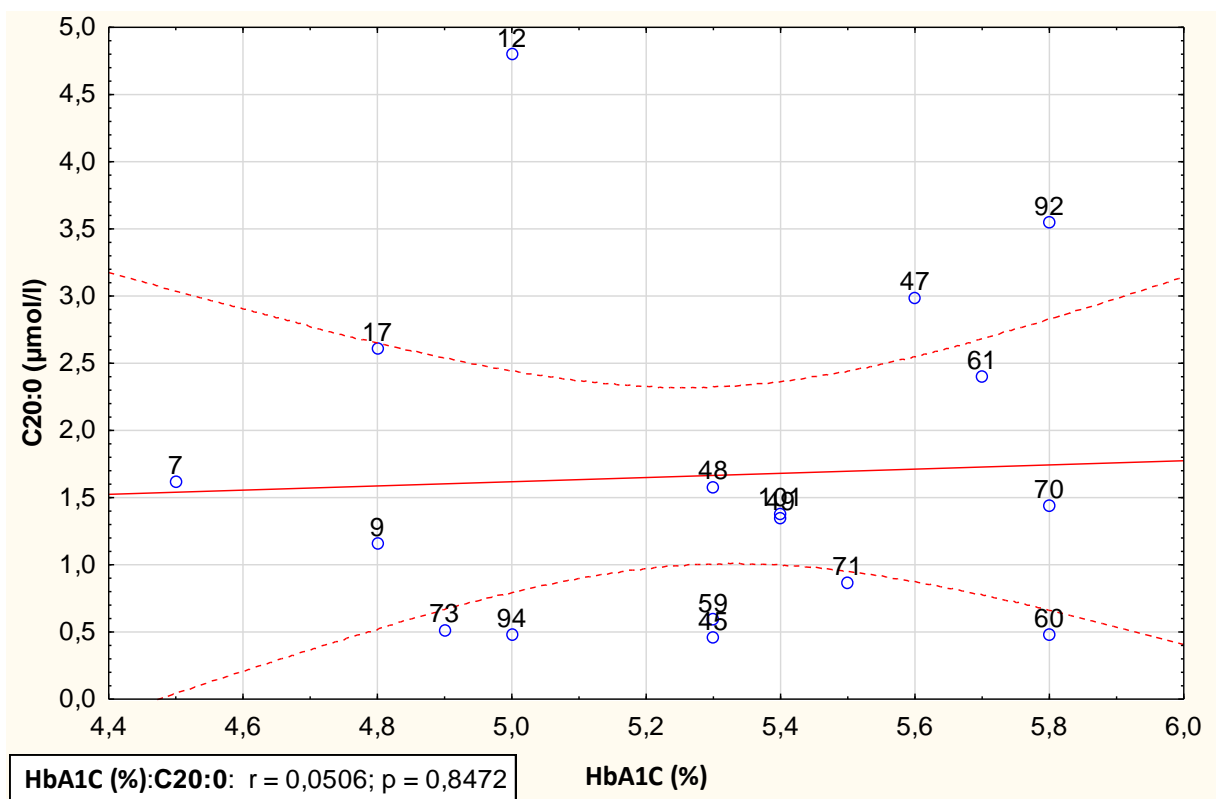
Graf 6 Závislost kyseliny nervonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků



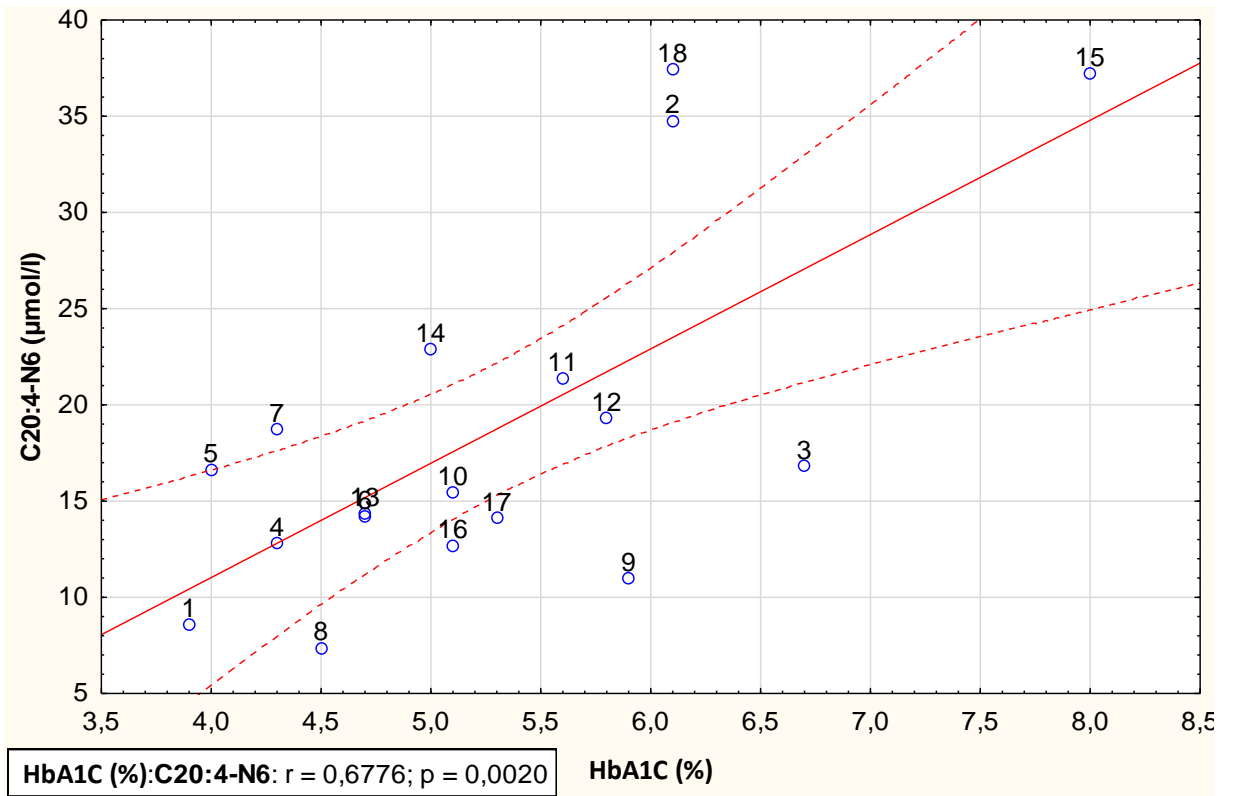
Graf 7 Závislost kyseliny nervonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců



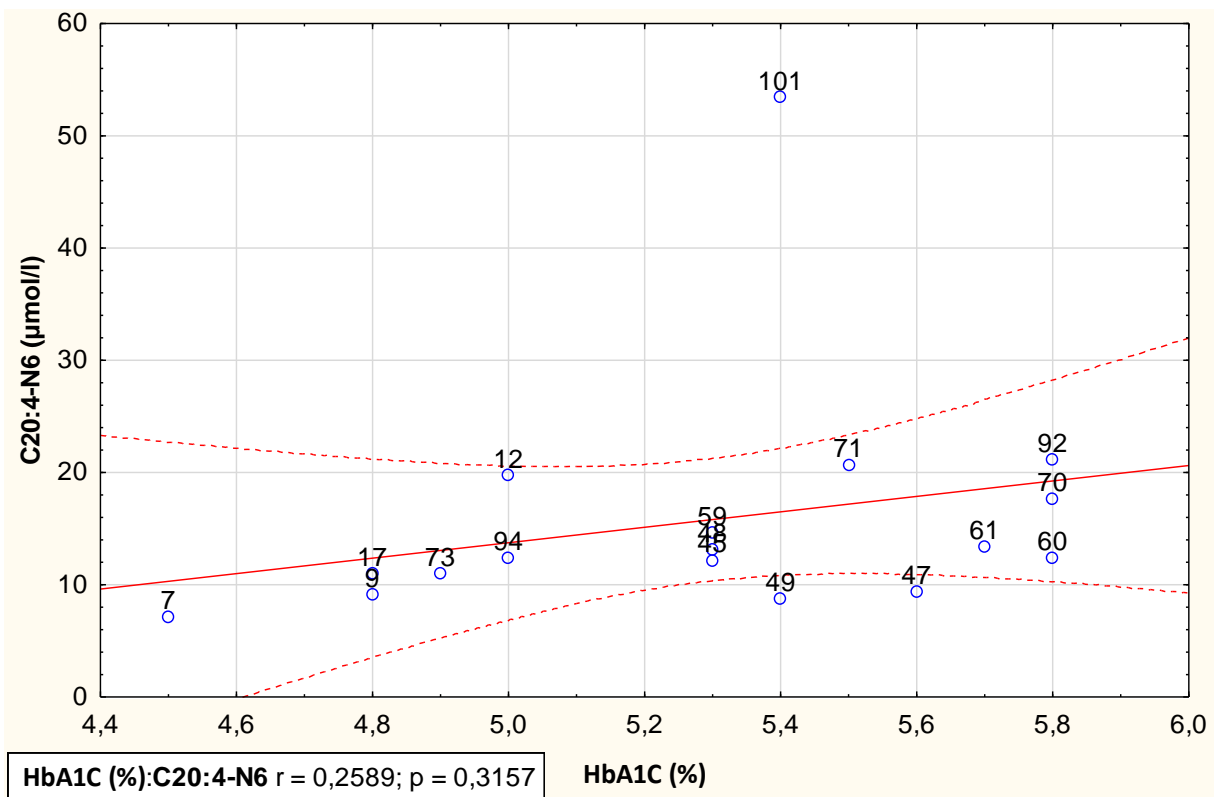
Graf 8 Závislost kyseliny arachové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků



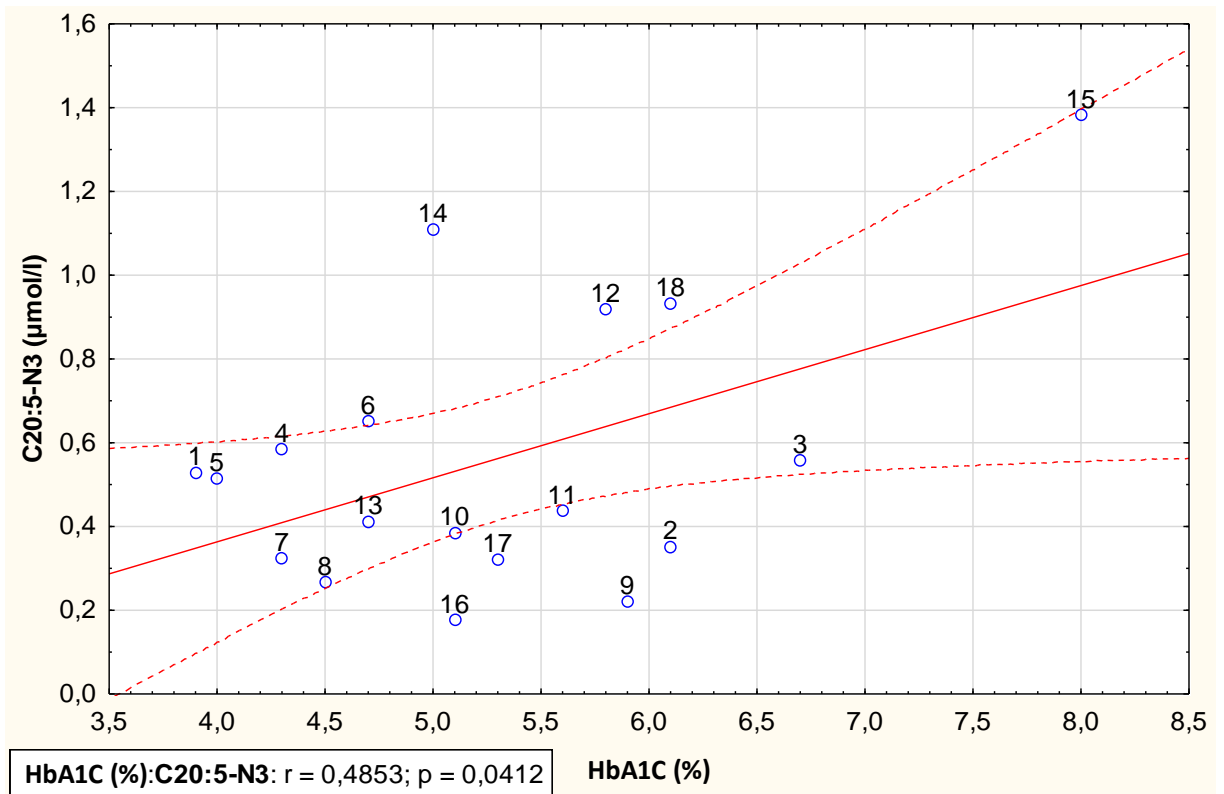
Graf 9 Závislost kyseliny arachové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců



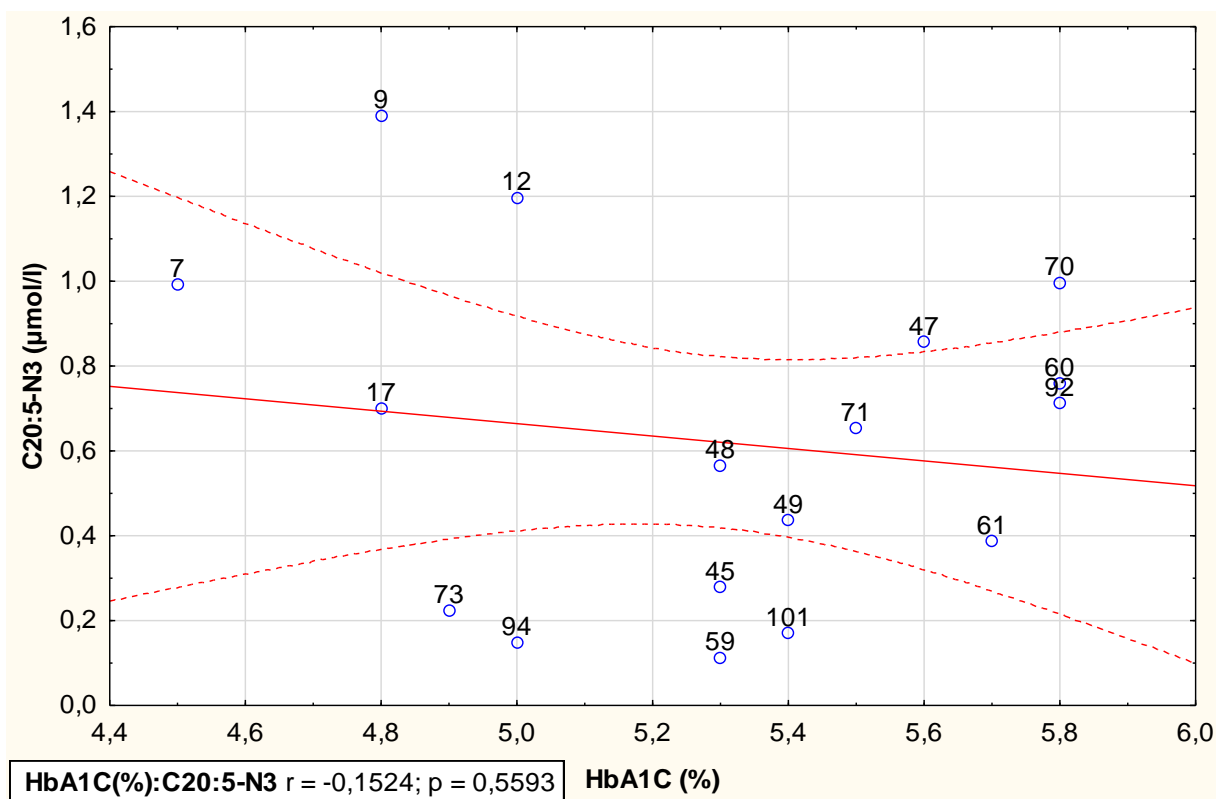
Graf 10 Závislost kyseliny arachidonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u diabetiků



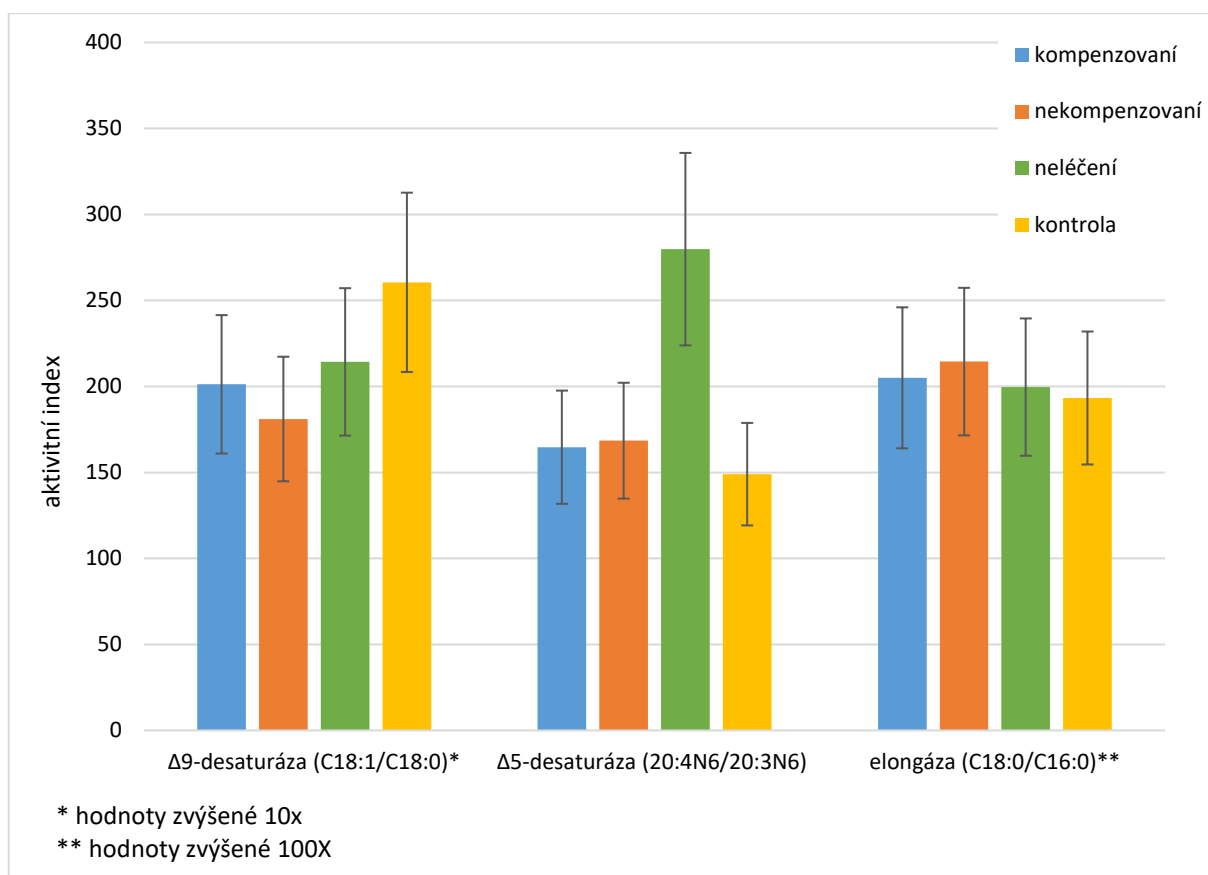
Graf 11 Závislost kyseliny arachidonové na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG u zdravých dárců



Graf 12 Závislost kyseliny eikosapentaenové na glykovaném hemoglobinu ve frakci FFA u diabetiků

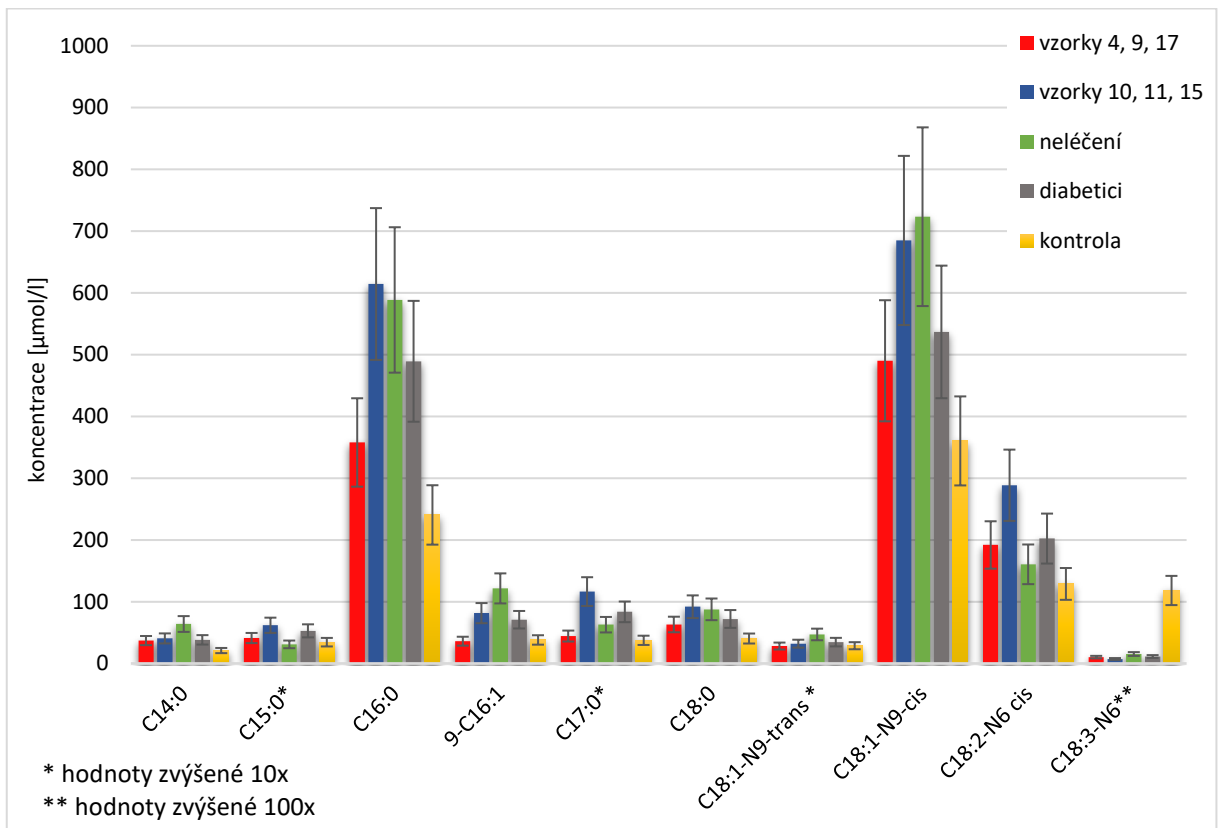


Graf 13 Závislost kyseliny eikosapentaenové na glykovaném hemoglobinu ve frakci FFA u zdravých dárců

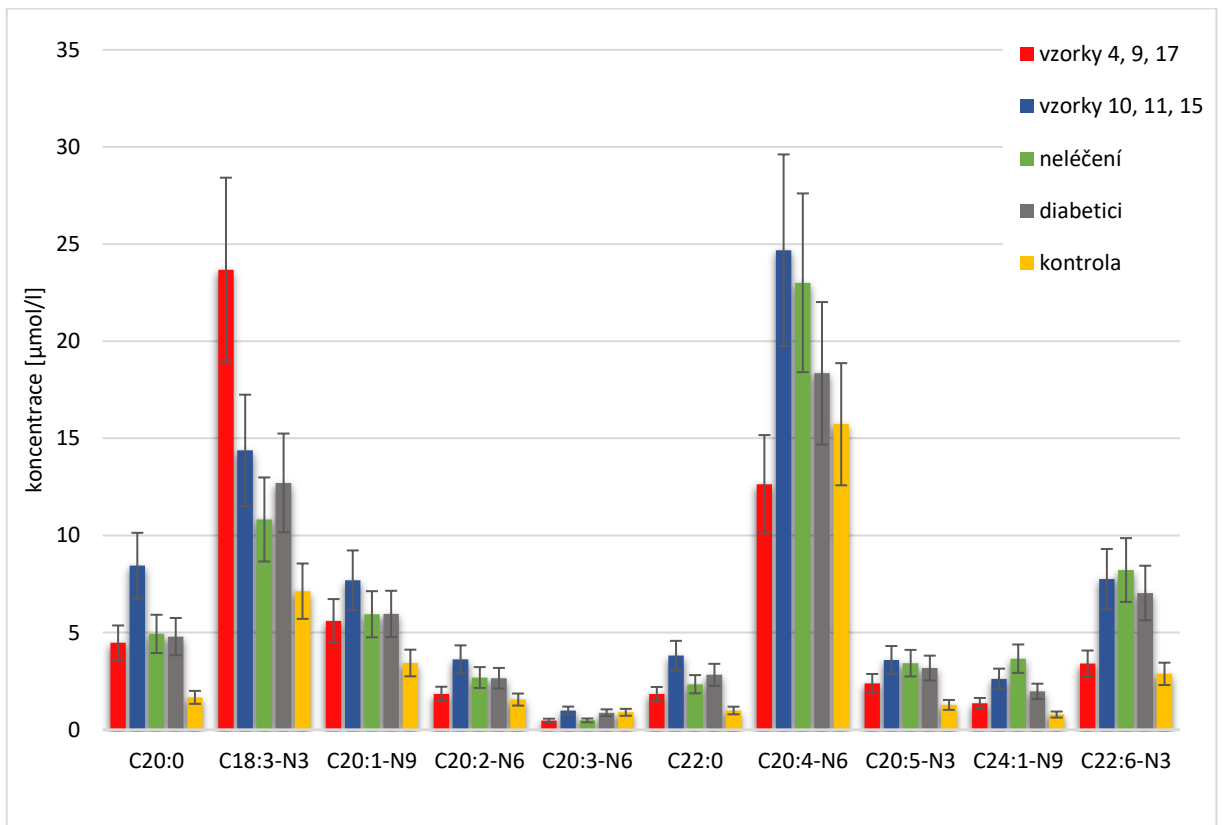


Graf 14 Aktivitní indexy enzymů v plazmě

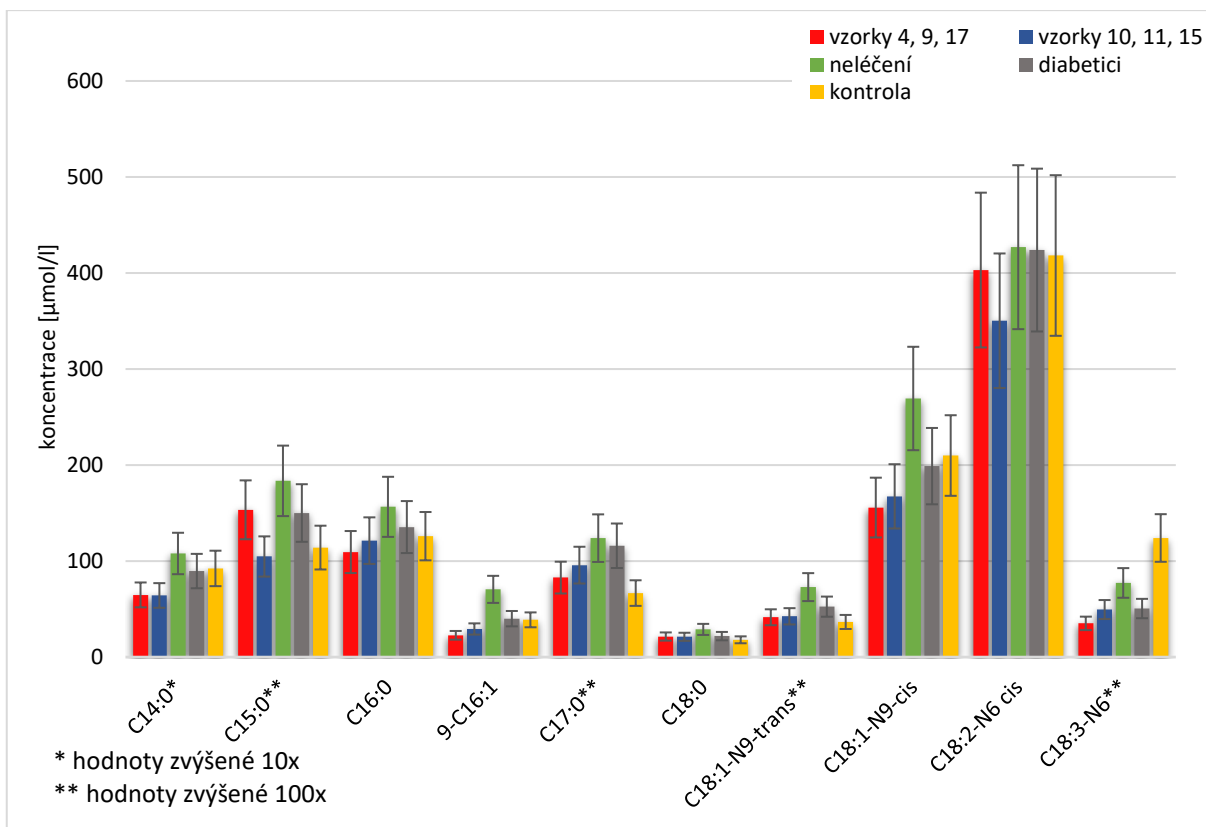
7.5 Léčba metforminem



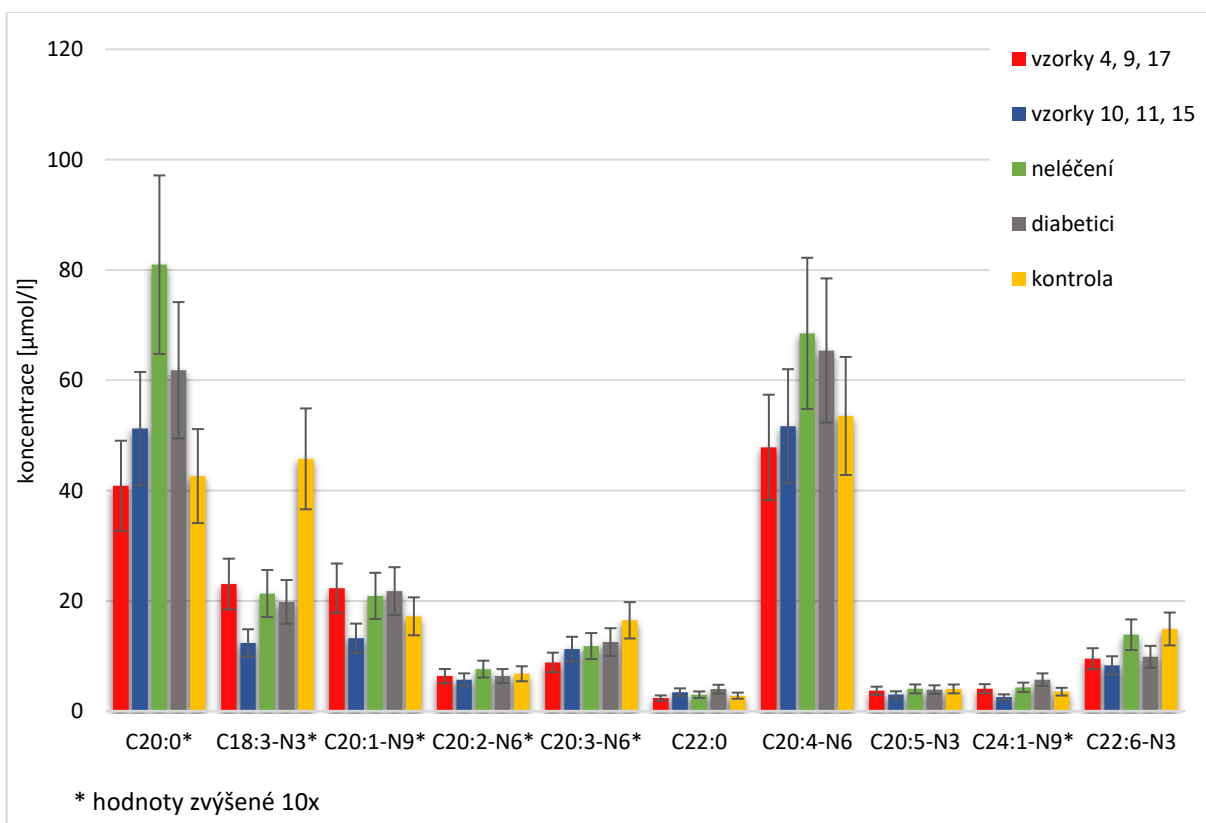
Graf 15 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci TG



Graf 16 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci TG



Graf 17 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci EC



Graf 18 Zastoupení MK u vybraných vzorků ve frakci EC

8 DISKUZE

Charakteristickým znakem diabetu 2. typu je inzulínová rezistence, která je spojena s metabolickými a kardiovaskulárními poruchami jako jsou: dyslipidémie, hypertenze, viscerální obezita, hyperinzulinémie a endoteliální dysfunkce. Dlouhodobě zvýšená hladina glykémie může vést k poškození řady tkání a orgánů, zejména zraku, ledvin, nervů a krevních cév [77, 78].

Dyslipidémie doprovázející inzulínovou rezistenci je charakterizována zvýšenou koncentrací TG ve frakci VLDL, zvýšeným výskytem malých LDL s vyšší hustotou a snížením koncentrace HDL. Pro vznik dyslipidémie jsou zásadní volné mastné kyseliny, které jsou nadměrně uvolňovány do krve z tukové tkáně v důsledku nedostatečné inhibice enzymu hormon senzitivní lipázy. Zvýšená koncentrace volných mastných kyselin stimuluje v hepatocytech vyšší produkci VLDL. Nadměrné množství těchto lipoproteinů je spojeno s poruchami vazodilatační schopnosti endotelu, s vyšší produkcí zánětlivých cytokinů, s aktivací monocytů a se zvýšenou náchylností aterosklerotického plátu k ruptuře [5].

Vzhledem k vysokému kardiovaskulárnímu riziku diabetiků 2. typu se léčba těchto pacientů zaměřuje nejen na zvýšenou hladinu glykémie, ale také na léčbu arteriální hypertenze, dyslipidémie a eliminaci chronických diabetických komplikací (neuropatie, retinopatie, nefropatie). Léčba diabetiků je primárně prováděna pomocí metforminu, statinů, farmak blokuje enzym angiotenzin-konvertázu a dalších perorálních antidiabetik. Metformin je inzulínový senzitivizátor se skupiny biguanidů, který zvyšuje citlivost k inzulínu především v játrech a svalové tkáni. Jeho hlavním účinkem je inhibice glukoneogeneze v játrech. Dále také zvyšuje transport glukózy a ukládání glykogenu ve svalu, snižuje oxidaci FFA, ve střevě snižuje vstřebávání glukózy, tlumí proliferaci nádorových buněk, snižuje hladiny PAI-1 a omezuje tvorbu volných kyslíkových radikálů. Jednou z jeho velkých výhod je nízká cena a také to, že u pacientů nevyvolává nárůst hmotnosti, naopak tělesnou hmotnost pomáhá redukovat [78].

Účinky metforminu jsou komplexní. Během léčby dochází ke snížení glykémie, koncentrace glykovaného hemoglobinu, koncentrace LDL a celkového cholesterolu (viz Graf 1). Zvýšení TG, které je prakticky vždycky doprovázené poklesem HDL a zvýšením LDL bylo nalezeno i u analyzovaných vzorků pacientů s DM2T. Diabetici mají v porovnání se zdravými dárci vyšší hladinu celkového cholesterolu. Nejvýraznější rozdíly mezi diabetiky léčenými a neléčenými jsou v obsahu TG (viz Graf 1). Naopak obsah HDL a LDL je u všech skupin diabetiků téměř srovnatelný.

Protože působení metforminu na dyslipidémii není v současnosti přesně popsáno, je cílem této diplomové práce studium jeho vlivu na dyslipidémii, a to analýzou koncentrací mastných kyselin v jednotlivých lipidových frakcích plazmy.

Zjistili jsme, že metformin upravuje hladiny mastných kyselin v plazmě u kompenzovaných pacientů do fyziologického rozmezí srovnatelného s kontrolní skupinou (viz Grafy 2 a 3). U nekompenzovaných diabetiků byly nalezeny větší rozdíly, a to u kyseliny palmitové, kyseliny eikosatrienové, kyseliny arachidonové a kyseliny eikosapentaenové. U neléčených diabetiků byly největší rozdíly v obsahu kyseliny myristové, kyseliny palmitové, kyseliny olejové a u většiny esenciálních mastných kyselin.

Velmi důležitým faktorem ovlivňujícím koncentraci mastných kyselin v jednotlivých frakcích plazmy jsou aktivity lipogenních enzymů desaturáz a elongáz, které jejich složení regulují. Bylo zjištěno, že u všech námi studovaných diabetiků dochází ke změnám v jejich aktivitách, vyjádřených v aktivitních indexech (viz Graf 14). Tyto rozdíly se výsledně projevují v růstu koncentrací některých mastných kyselin v určitých plazmatických frakcích. Nejvýraznější změny aktivitních indexů byly nalezeny u enzymu Δ^5 -desaturázy, především ve frakci PL (viz Tabulka 10–12). Tento enzym se podílí na syntéze esenciálních mastných kyselin jako je např. kyselina arachidonová (C20:4-N6) nebo kyselina eikosapentaenová (C20:5-N3). Aktivitní index Δ^5 -desaturázy u neléčených diabetiků dosahuje v porovnání s kontrolní skupinou a ostatními skupinami diabetiků až dvojnásobné hodnoty. U obou skupin léčených diabetiků je jeho aktivitní index srovnatelný. Aktivitní index elongázy je pro všechny sledované skupiny téměř totožný. Statisticky významné rozdíly v aktivitě enzymu Δ^9 -desaturázy mezi diabetiky a kontrolními vzorky byly nalezeny ve frakci PL, DG a EC (viz Tabulka 10). U jednotlivých skupin diabetiků je aktivitní index tohoto enzymu shodný. Enzym Δ^9 -desaturáza katalyzuje vznik cis-dvojnásobné vazby u mastných kyselin s 12 až 19 atomy uhlíků, čímž mění toxické SFA na MUFA. Hlavním substrátem Δ^9 -desaturázy je kyselina palmitová a kyselina stearová. Tento enzym má rozhodující roli ve vývoji řady onemocnění jako je např. diabetes mellitus, jaterní steatóza a ateroskleróza [79].

Přestože metformin plošně snižuje hladiny MK v plazmě, byly nalezeny zvýšené koncentrace některých mastných kyselin. U pacientů s DM2T byly zaznamenány statisticky významné pozitivní korelace glykovaného hemoglobinu a kyselinou palmitovou, kyselinou nervonovou, kyselinou arachidovou, kyselinou arachidonovou a kyselinou eikosapentaenovou. Zvýšené koncentrace těchto kyselin u diabetiků by mohly být využity v diagnostice onemocnění diabetes mellitus typu 2.

Zvýšení kyseliny palmitové (C16:0) u diabetiků (viz Graf 4) koreluje se sníženou aktivitou Δ^9 -desaturázy, která katalyzuje desaturaci kyseliny palmitové na kyselinu palmitoolejovou. U zdravých dárců se koncentrace kyseliny palmitové se zvyšujícím se glykovaným hemoglobinem nemění (viz Graf 5). Kyselina palmitová a zvýšená koncentrace glukózy v oběhu snižují proliferaci β -buněk, poškozují jejich funkci a indukují apoptózu. Účinek kyseliny palmitové je zprostředkován tvorbou ceramidů a aktivací apoptické mitochondriální dráhy. Naopak kyselina palmitoolejová tyto toxické účinky potlačuje [80].

Koncentrace kyseliny nervonové (C24:1-N9) u diabetiků se zvyšujícím se glykovaným hemoglobinem stoupá (viz Graf 6), zatímco u zdravých dárců se nemění (viz Graf 7). Kyselina nervonová je produktem elongace kyseliny erukové (C22:1-N9), která vzniká následnými elongacemi z kyseliny olejové. Vzhledem k mírně zvýšené aktivitě elongázy u diabetiků, se proto koncentrace kyseliny nervonové zvyšuje.

Zvýšení koncentrace kyseliny arachové (C20:0) s rostoucí hodnotou glykovaného hemoglobinu (viz Graf 8) opět přisuzujeme zvýšené aktivitě elongázy. Koncentrace kyseliny arachové se v závislosti na obsahu glykovaného hemoglobinu u zdravých dárců nemění (viz Graf 9).

Kyselina arachidonová patří společně s kyselinou linolovou k nejvíce zastoupeným polynenasyceným mastným kyselinám v lidském organismu. Nadměrný výskyt těchto prozánětlivých ω -6 mastných kyselin se u diabetiků projevuje výskytem inzulinové rezistence a vývojem neinfekčního zánětu charakterizovaným vznikem tzv. diabetické nohy. Kyselina arachidonová je přijímána z potravy anebo vzniká následným působením Δ^6 -desaturázy-elongázy- Δ^5 -desaturázy z kyseliny linolové [8]. U naší skupiny diabetiků byl nalezen růst její koncentrace v závislosti na glykovaném hemoglobinu ve frakci TG, která je syntetizována v játrech (viz Graf 10 a 11). Tento nálezn je v souladu se zvýšenou aktivitou Δ^5 -desaturázy a elongázy (viz Graf 14). Obdobně vysvětlujeme vzrůst koncentrace kyseliny eikosapentaenové (viz Graf 12), která je syntetizována z kyseliny α -linolenové působením stejných enzymů. U zdravých dárců se koncentrace kyseliny eikosapentaenové v závislosti na glykovaném hemoglobinu nepatrně snižuje (viz Graf 13).

Na závěr jsme se zaměřili na pacienty, u kterých se nepodařilo normalizovat dyslipidémii. U diabetiků se zvýšenou koncentrací celkového cholesterolu a LDL (vzorky 4, 9, 17) byly ve srovnání s ostatními diabetiky ve frakci TG nalezeny snížené koncentrace kyseliny palmitové, kyseliny olejové, kyseliny linolové a všech dalších esenciálních mastných kyselin (viz Graf 15 a 16) s výjimkou koncentrace kyseliny α -linolenové, která byla oproti kontrolní

skupině dvojnásobná. Nepodstatné rozdíly byly nalezeny i ve frakci EC. Vysvětlení těchto disproporcí je obtížné. Jedná se zřejmě o různou reakci pacientů na léčbu a odstranění těchto poruch bude zřejmě možné aplikací dalšího léčiva, které sníží hladinu cholesterolu (statiny, fibráty).

Další skupina pacientů (vzorky 10, 11, 15) vykazující hodnoty TG a HDL mimo fyziologické rozmezí měla lipidogram téměř opačný než první skupina. Jejich koncentrace mastných kyseliny byly ve frakci TG srovnatelné s neléčenou skupinou (viz Graf 15 a 16), a proto se domníváme, že jejich léčba bude vyžadovat zvýšení dávky metforminu. Změny ve frakci EC nebyly podstatné. Zastoupení mastných kyselin u neléčených diabetiků by mohlo být využito ke sledování účinnosti dané dávky metforminu.

9 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly stanoveny koncentrace vybraných mastných kyselin ve všech lipidových frakcích EDTA plazmy pacientů s diabetes mellitus 2. typu a zdravých dárců. Analyzováno bylo celkem 35 vzorků, 17 od vzorků zdravých dárců a 18 vzorků od diabetiků. Všechny vzorky byly zpracovány stejným postupem. Pomocí tenkovrstvé chromatografie byly vzorky nejprve rozděleny do 5 lipidových frakcí. Poté byly přítomné mastné kyseliny derivatizací převedeny na odpovídající methylestery a pomocí plynové chromatografie byla stanovena jejich koncentrace. Získaná data byla statisticky analyzována a graficky zpracována pomocí programů Microsoft Office Excel 2016 a Statistica 12.

Cílem této diplomové práce bylo popsat vliv metforminu na dyslipidémii doprovázející diabetes mellitus 2. typu. Dyslipidémie se u těchto pacientů projevuje zvýšenou koncentrací celkového cholesterolu, LDL, TG a sníženou koncentrací HDL. Účinky metforminu nejsou zaměřeny pouze na metabolismus glukózy, ale jsou komplexní. U pacientů léčených metforminem byl zaznamenán pokles koncentrace TG, LDL a celkového cholesterolu. Přestože metformin upravuje tyto biochemické parametry dyslipidémie, byly nalezeny vymykající se vzorky. Rozdíly u pacientů se zvýšeným celkovým a LDL cholesterolem se projevují ve frakci TG změnou v zastoupení mastných kyselin, především nárůstem kyseliny α -linolenové, a jsou zřejmě způsobeny individuální reakcí diabetiků na léčbu metforminem. U pacientů, kteří mají mimo fyziologické rozmezí hodnoty TG a HDL, je zastoupení mastných kyselin opačné. Tento náález by mohl být využit pro sledování účinnosti léčby určitou dávkou metforminu.

Zjistili jsme, že metformin upravuje hladiny mastných kyselin v plazmě u kompenzovaných diabetiků do fyziologického rozmezí srovnatelného s kontrolní skupinou. U nekompenzovaných diabetiků byly nalezeny větší rozdíly u kyseliny palmitové, kyseliny eikosatrienové, kyseliny arachidonové a kyseliny eikosapentaenové.

Dále byly objeveny rozdíly v aktivitách lipogenních enzymů Δ^5 -desaturázy, Δ^9 -desaturázy a elongázy. U diabetiků je aktivita Δ^5 -desaturázy a elongázy zvýšená, naopak aktivita Δ^9 -desaturázy je nižší. Statisticky významné závislosti obsahu mastných kyselin na glykovaném hemoglobinu odpovídají zjištěným změnám aktivit těchto enzymů.

Pro další výzkum působení metforminu bude nutné rozšířit studovanou skupinu diabetiků a zdravých dárců s obsáhlejšími biochemickými parametry.

10 POUŽITÁ LITERATURA

- 1 SEARS, B., PERRY, M. *The role of fatty acids in insulin resistance*. *Lipids in Health and Disease*, 2015, 14(121), s. 1–9.
- 2 RUAN, H., LODISH, H. F. *Insulin resistance in adipose tissue: Direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α* . *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2003, 14(5), s. 447–455.
- 3 SKYLER, S. J. *Atlas of diabetes*. 4th. New York: Springer Science and Business Media, 2012, ISBN 978-1-4614-1027-0.
- 4 BODEN, G. *Obesity, insulin resistance and free fatty acids*. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 2011, 18(2), s. 139–143.
- 5 PERUŠIČOVÁ, J. et al. *Prediabetes, prehypertenze, dyslipidemie a metabolický syndrom*. 1. Praha: Maxdorf s.r.o., 2012, ISBN 978-80-7345-272-8.
- 6 HARVEY, R. A., FERRIER, D. R. *Lippincott's illustrated reviews: biochemistry*. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014, ISBN 978-1451175622.
- 7 WAJCHENBERG B. L. *Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome*. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(6), s. 1697–738.
- 8 PAHLAVANI, M., RAMALHO, T., KOBOZIEV, I., et al. *Adipose tissue inflammation in insulin resistance: Review of mechanisms mediating anti-inflammatory effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids*. *Journal of Investigative Medicine*, 2017, 65(7), s. 1021–1027.
- 9 OH, D. Y., OLEFSKY, J. M. *Omega 3 fatty acids and GPR120*. *Cell Metabolism*, 2012, 15(5), s. 564–565.
- 10 GASTALDELLI, A., GAGGINI, M., RALPH, A., et al. *Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study*. *Diabetes*, 2017, 66(4), s. 815–822.
- 11 KERSHAW, E. E., FLIER, J. S. *Adipose tissue as an endocrine organ*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004, 89(6), s. 2548–2556.
- 12 POLÁK, M. J., KLIMČÁKOVÁ, M. E., KOVÁČIKOVÁ, et al. *Endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inzulinové rezistence*. *Interní medicína pro praxi*, 2006, 8(10), s. 443–446.
- 13 CHANDRAN, M., PHILLIPS, A. S., CIARALDI, T., et al. *Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone?* *Diabetes Care*, 2003, 26(8), s. 2442–2450.

- 14 NOVOTNÝ, D., VAVERKOVÁ, H., KARÁSEK, D., HALENKA, M. *Adiponektin-Parametr s protizánětlivým a protiaaterogenním potenciálem.* Klinická biochemie a metabolismus, 2008, 16(3), s. 171–177.
- 15 HALLIKAINEN, M., KOLEHMAINEN, M., SCHWAB, U., et al. *Serum adipokines are associated with cholesterol metabolism in the metabolic syndrome.* Clinica Chimica Acta, 2007, 383(1–2), s. 126–132.
- 16 AKASH H. S. M., REHMAN K., CHEN S. *Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.* Journal of Cellular Biochemistry, 2013, 114(3), s. 525–231.
- 17 FERNÁNDEZ-REAL, M. J., RICART, W. *Insulin Resistance and Chronic Cardiovascular Inflammatory Syndrome.* Endocrine Reviews, 2003, 24(3), s. 278–301.
- 18 WELLEN, K. E., HOTAMISLIGIL, G. *Inflammation, stress, and diabetes.* The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(5), s. 1111–1119.
- 19 TANGVARASITTICHAJ, S., PONGTHAISONG, S., TANGVARASITTICHAJ, O. *Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-6, C-Reactive Protein Levels and Insulin Resistance Associated with Type 2 Diabetes in Abdominal Obesity Women.* Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2016, 31(1), s. 68–74.
- 20 GUILHERME, A., VIRBASIJUS, J. V., PURI, V., CZECH, M. P. *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(5), s. 367–377.
- 21 DEFRONZO, R. A., TRIPATHY, D. *Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2009, 32(2), s. 157–163.
- 22 WILCOX, G. *Insulin and insulin resistance.* The Clinical Biochemist. Reviews/Australian Association of Clinical Biochemists, 2005, 26(2), s. 19–39.
- 23 ABDUL-GHANI, M. A., DEFRONZO, R. A. *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle.* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010.
- 24 AMATI, F., DUBÉ, J. J., ALVAREZ-CARNERO, E., EDREIRA, M. M., CHOMENTOWSKI, P., et al. *Skeletal Muscle Triglycerides, Diacylglycerols, and Ceramides in Insulin Resistance Another Paradox in Endurance-Trained Athletes?* Diabetes, 2011, 60(10), s. 2588–2597.
- 25 KIRWAN, J. P. *Plasma ceramides target skeletal muscle in type 2 diabetes.* Diabetes, 2013, 62(2), s. 352–354.

- 26 BERGMAN, B. C., KEREGE, A., et al. *Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans*. *Diabetologia*, 2012, 55(4), s. 1140–1150.
- 27 JHENG, H. F., TSAI P. J., et al. *Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle*. *Molecular and cellular biology*, 2012, 32(2), s. 309–319.
- 28 ECKARDT, K., TAUBE, A., ECKEL, J. *Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2011, 12(3), s. 163–172.
- 29 SAMUEL, V. T., SHULMAN, G. I. *The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux*. *The Journal of clinical investigation*, 2016, 126(1), s. 12–22.
- 30 PETERSEN, M. C., VATNER, D. F., SHULMAN, G. I. *Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease*. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017, 13(10), s. 572–587.
- 31 MUOIO, D. M., NEWGARD, C. B. *Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(3), s. 193–205.
- 32 ZIPES, P. D., LIBBY, P., et al. *Braunwald's Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 7th. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015, ISBN 9781416000389.
- 33 VELASQUEZ, C., VASQUEZ, J. S., BALCAZAR, N. *In Vitro Effect of Fatty Acids Identified in the Plasma of Obese Adolescents on the Function of Pancreatic β -Cells*. *Diabetes & metabolism journal*, 2017, 41(4), s. 303–315.
- 34 POITOUT, V., ROBERTSON, R. P. *Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity*. *Endocrinology*, 2002, 143(2), s. 339–342.
- 35 HAINER, V., et al. *Základy klinické obezitologie: 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing a. s., 2011, ISBN 978-80-247-3252-7.
- 36 GUTCH, M., KUMAR, S., et al. *Assessment of insulin sensitivity/resistance*. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 2015, 19(1), s. 160–164.

- 37 ALTIERI, P. I., MARCIAL, J. M., ESCOBALES, N., et al. *The Metabolic Syndrome in Hispanics – The Role of Insulin Resistance and Inflammation*. [online]. InTech, 2012, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/insulin-resistance/the-metabolic-syndrome-in-hispanics-the-role-of-insulin-resistance-and-inflammation>
- 38 HALUZÍK, M., TRACHTA, P., URBANOVÁ, M. *Perorální antidiabetika v léčbě diabetes mellitus 2. typu*. Kapitoly z kardiologie pro praktické lékaře, 2012 4(2), s. 57–63.
- 39 BODEN, G., LAAKSO, M. *Lipids and glucose in type 2 diabetes: what is the cause and effect?* Diabetes care, 2004, 27(9), s. 2253–2259.
- 40 SEINO, Y., NANJO, K. et al. *Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus*. Journal of diabetes investigation, 2010, 1(5), s. 212–228.
- 41 EIZIRIK, D. L., CARDOZO, A. K., CNOP, M. *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocrine reviews, 2007, 29(1), s. 42–61.
- 42 CHEN, L., MAGLIANO, D. J., ZIMMET, P. Z. *The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus – present and future perspectives*. Nature Reviews Endocrinology, 2012, 8(4), s. 228–236.
- 43 FLEKAČ, M. *Perorální antidiabetika v léčbě diabetes mellitus 2. typu*. Medicína pro praxi, 2009, 6(3), s. 140–143.
- 44 ŠPITÁLNÍKOVÁ, S. *Trendy ve vývoji nových perorálních antidiabetik*. [online]. Zdravotnický deník, 2017, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <http://www.zdravotnickydenik.cz/2017/01/trendy-ve-vyvoji-novych-peroralnich-antidiabetik/>
- 45 KOOLMAN, J., ROEHM K. H. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005, ISBN 3-13-100372-3.
- 46 RISÉRUS, U., WILLETT, W. C., HU, F. B. *Dietary fats and prevention of type 2 diabetes*. Progress in lipid research, 2009, 48(1), s. 44–51.
- 47 HODGE, A. M., English D. R., et al. *Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid*. The American journal of clinical nutrition, 2007, 86(1), s. 189–197.
- 48 MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. Praha: Galén, 2010, ISBN 978-80-7262-702-8.

- 49 QUEHENBERGER, O., ARMANDO, M. A., et al. *Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma*. *Journal of lipid research*, 2010, 51(11), s. 3299–3305.
- 50 JAWORSKI, K., DUNCAN, E. R., et al. *Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, 293(1), s. G1-G4.
- 51 DE SOUZA, R. J., KISHIBE, T., et al. *Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies*. [online]. *BMJ*, 2015, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <https://www.bmj.com/content/351/bmj.h3978/>
- 52 FOROUHI, N. G., KOULMAN, A., et al. *Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study*. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 2014, 2(10). s. 810–818.
- 53 GILLINGHAM, L. G., HARRIS-JANZ, S., JONES, P, JH. *Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors*. *Lipids*, 2011, 46(3), s. 209–228.
- 54 STIRBAN, A., NANDREAN, S., et al. *Effects of n–3 fatty acids on macro-and microvascular function in subjects with type 2 diabetes mellitus*. *The American journal of clinical nutrition*, 2010, 91(3), s. 808–813.
- 55 VAN ROOYEN, D. M., LARTER, Z. C., et al. *Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis*. *Gastroenterology*, 2011, 141(4), s. 1393–1403.
- 56 MATTHAN, N. R., LICHTENSTEIN, A. H. *Approaches to measuring cholesterol absorption in humans*. *Atherosclerosis*, 2004, 174(2), s. 197–205.
- 57 PIHLAJAMÄKI, J., GYLLING, H., et al. *Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men*. *Journal of Lipid Research*, 2004, 45(3), s. 507–512.
- 58 SIMONEN, P. P., GYLLING, H. K., MIETTINEN, T. A. *Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity*. *Diabetes care*, 2002, 25(9), s. 1511–1515.
- 59 RADER, J. D., HOBBS, H. H. *Disorders of Lipoprotein Metabolism*. [online]. *Thoracic Key*, 2016, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <https://thoracickey.com/disorders-of-lipoprotein-metabolism/>

- 60 GINSBERG, H. N., ZHANG, Y. L., HERNANDEZ-ONO, A. *Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes*. Archives of medical research, 2005, 36(3), s. 232–240.
- 61 CHOI, S. H., GINSBERG, H. N. *Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2011, 22(9), s. 353–363.
- 62 GARVEY, W. T., KWON S., et al. *Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance*. Diabetes, 2003, 52(2), s. 453–462.
- 63 ENKHMAA, B., OZTURK Z., et al. *Postprandial lipoproteins and cardiovascular disease risk in diabetes mellitus*. Current diabetes reports, 2010, 10(1), s. 61–69.
- 64 VON ECKARDSTEIN, A., WIDMANN, CH. *High-density lipoprotein, beta cells, and diabetes*. Cardiovascular research, 2014, 103(3), s. 384–394.
- 65 AMUSQUIVAR, E., SCHIFFNER, S., HERRERA, E. *Evaluation of two methods for plasma fatty acid analysis by GC*. European Journal of Lipid Science and Technology. 2011, 113(6), str. 711–716.
- 66 LÖFGREN, L., FORSBERG G. B., STÅHLMAN, M. *The BUME method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue*. Scientific Reports, 2016, 6(1).
- 67 OPEKAR, F. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0553-8.
- 68 DHONT, J., BERGHE E. V. *Extraction and separation of fats and lipids*. [online]. Analytical Techniques in Aquaculture Research, 2003 [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: http://www.aquaculture.ugent.be/Education/coursematerial/online%20courses/ATA/analysis/lip_extr.htm
- 69 BERNARD-SAVARY, P., POOLE, F. C. *Instrument platforms for thin-layer chromatography*. Journal of Chromatography A. 2015, 1421(-), s. 184–202.
- 70 ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. 1. Praha: Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0852-9.
- 71 KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, ISBN 80-863-6907-2.
- 72 ICHIHARA, K., FUKUBAYASHI, Y. *Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography*. Journal of lipid research, 2010, 51(3), s. 635–640.

- 73 CARVALHO, A. P., MALCATA, F. X. *Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(13), s. 5049–5059.
- 74 EDER, K. *Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1995, 671(1-2), s. 113–131
- 75 VOLKA, K., et al. *Analytická chemie II. 1*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995, ISBN 80-7080-227-8.
- 76 ECKER, J., SCHERER, M. et al. *A rapid GC–MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters*. Journal of Chromatography B, 2012, 897(-), s. 98–104.
- 77 DEFRONZO, R. A. *Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: The missing links*. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*, 2010, 53(7), s. 1270–1287.
- 78 HALUZÍK, M. *Metformin a jeho postavení v léčbě diabetes mellitus 2. typu*. Interní medicína, 2014, 16(2), s. 67–69.
- 79 SAMPATH, H., NTAMBI, J. M. *The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, 1243(1), s. 47–53.
- 80 MAEDLER, K., OBERHOLZER, J., et al. *Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β -cell turnover and function*. Diabetes, 2003, 52(3), s. 726–733.

11 ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK

- 1 PERUŠIČOVÁ, J., et al. *Prediabetes, prehypertenze, dyslipidemie a metabolický syndrom*. 1. Praha: Maxdorf s.r.o., 2012. ISBN 978-80-7345-272-8.
- 2 KERSHAW, E. E., FLIER, J. S. *Adipose tissue as an endocrine organ*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004, 89(6), s. 2548–2556.
- 3 POLÁK, M. J., KLIMČÁKOVÁ, M. E., KOVÁČIKOVÁ, M. M., et al. *Endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inzulinové rezistence*. *Interní medicína pro praxi*, 2006, 8(10), s. 443–446.
- 4 TATEYA, S., KIM, F., TAMORI, Y. *Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance*. [online]. *Frontiers in endocrinology*, 2013, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2013.00093/full#h2>
- 5 PETERSEN, M. C., VATNER, D. F., SHULMAN, G. I. *Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease*. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017, 13(10), s. 572–587.
- 6 URIBARRI, J., CAI, W., RAMDAS, M., et al. *Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1*. [online]. *Diabetes Care*, 2011, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <https://www.nutrimedical.com/age-restriction-may-preserve-native-defences-and-insulin-sensitivity-by-maintaining-lower-basal-oxidative-stress/>
- 7 SEINO, Y., NANJO, K. et al. *Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus*. *Journal of diabetes investigation*, 2010, 1(5), s. 212–228.
- 8 HALUZÍK, M., TRACHTA, P., URBANOVÁ, M. *Perorální antidiabetika v léčbě diabetes mellitus 2. typu*. *Kapitoly z kardiologie pro praktické lékaře*, 2012 4(2), s. 57–63.
- 9 FLEKAČ, M. *Perorální antidiabetika v léčbě diabetes mellitus 2. typu*. *Medicína pro praxi*, 2009, 6(3), s. 140–143.
- 10 ŠPITÁLNÍKOVÁ, S. *Trendy ve vývoji nových perorálních antidiabetik*. [online]. *Zdravotnický deník*, 2017, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <http://www.zdravotnickydenik.cz/2017/01/trendy-ve-vyvoji-novych-peroralnich-antidiabetik/>

- 11 ANATOMY AND PHYSIOLOGY. *The Cellular Level of Organization*. OpenStax. *cnx.org*. [online]. © 1999-2018 [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <https://cnx.org/contents/FPtK1z mh@8.108:q2X995E3@12/The-Cell-Membrane>
- 12 HARVEY, R. A., FERRIER, D. R. *Lippincott's illustrated reviews: biochemistry*. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014, ISBN 978-1451175622.
- 13 CHHABRA N. *Reverse Cholesterol Transport and the Role of HDLc*. [online]. *Biochemistry for Medics*, 2012, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <http://www.namrata.co/reverse-cholesterol-transport-and-the-role-of-hdlc/>
- 14 RADER, J. D., HOBBS, H. H. *Disorders of Lipoprotein Metabolism*. [online]. Thoracic Key, 2016, [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <https://thoracickey.com/disorders-of-lipoprotein-metabolism/>
- 15 KOOLMAN, J., ROEHM K. H. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005, ISBN 3-13-100372-3.
- 16 MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. Praha: Galén, 2010, ISBN 978-80-7262-702-8.
- 17 MURRAY, K. R., BENDER, A. D. *Harpers's Illustrated Biochemistry*. 28th. New York: The McGraw-Hill Companies, 2009, ISBN 978-0-07-170197-6.
- 18 INTRODUCTION TO CAPILLARY GC INJECTION TECHNIQUES. Good Practices in Operating a Gas Chromatograph. *Chromedia.org*. [online]. 2018 [cit. 27. 3. 2018]. Dostupné z: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=wlqdcDsHiemBpdmBII EcCvBC&subNav=rwhpbjDsHiemBpdmBII EcCvBCyC>

12 PŘÍLOHY

Tabulka 8 Biochemické parametry vzorků zdravých dárců

číslo vzorku	HbA _{1C} (%)	pohlaví	celkový chol. (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)	TAG (mmol/l)	CRP (mg/dl)	Glukóza venózní (mmol/l)
7	4,5	F	6,97	0,49	2,07	1,17	2,03	7,20
9	4,8	F	5,20	1,00	3,75	1,22	-	4,95
12	5,0	F	7,94	1,66	4,50	3,59	0,10	4,60
17	4,8	F	4,78	1,42	2,51	0,84	0,58	7,15
47	5,6	M	6,05	1,03	4,45	2,22	-	5,65
49	5,4	F	5,12	2,46	2,28	0,75	1,14	4,30
61	5,7	F	6,52	1,89	4,06	0,95	0,21	4,95
45	5,3	F	4,32	1,32	2,66	0,73	0,02	-
48	5,3	F	4,53	1,66	2,72	1,81	3,47	-
59	5,3	F	4,37	2,30	1,86	0,81	0,05	-
60	5,8	F	8,04	1,84	5,51	1,14	0,18	-
70	5,8	F	5,35	1,42	3,44	1,96	0,07	6,90
71	5,5	F	5,74	1,42	4,19	1,77	-	5,10
73	4,9	F	4,32	1,58	2,61	0,47	0,01	4,70
92	5,8	F	6,78	0,93	3,57	3,78	1,80	6,00
94	5,0	F	7,73	2,22	5,20	1,93	0,29	-
101	5,4	F	4,19	1,11	2,56	1,49	-	5,35

Tabulka 9 Parametry přesnosti metody

Mastná kyselina	Sumární vzorec	Aritmetický průměr (µg/ml)	STD	CV (%)
Hexanová	C6:0	0,066	0,015	23,222
Oktanová	C8:0	0,052	0,019	36,876
Dekanová	C10:0	0,029	0,015	52,578
Undekanová	C11:0	0,055	0,014	25,061
Laurová	C12:0	0,138	0,071	51,224
Tridekanová	C13:0	0,029	0,008	27,148
Myristová	C14:0	1,018	0,106	10,456
Myristolejová	C14:1	0,038	0,014	38,264
Pentadekanová	C15:0	0,554	0,041	7,455
cis-10-Pentadecenová	C15:1	0,048	0,011	23,991
Palmitová	C16:0	84,657	2,002	2,365
Palmitolejová cis	9-C16:1	1,634	0,089	5,461
Heptadekanová	C17:0	1,562	0,083	5,336
cis-10-Heptadecenová	C17:1	0,018	0,012	68,643
Stearová	C18:0	43,198	0,690	1,597
trans Elaidová	C18:1-N9-trans	1,304	0,279	21,370
Olejová	C18:1-N9-cis	30,394	0,881	2,899
Linolelaidová	C18:2-N6-trans	0,147	0,032	21,831
Linoleová	C18:2-N6 cis	50,650	1,977	3,904
gamma-Linolenová	C18:3-N6	0,106	0,022	21,003
Arachová	C20:0	1,277	0,165	12,894
alpha-Linolenová	C18:3-N3	0,481	0,037	7,636
cis-11-Eikosaenová	C20:1-N9	0,555	0,039	7,056
IS Heneikosanová	C21:0	9,000	0,000	0,000
cis-11,14-Eikosadienová	C20:2-N6	0,965	0,081	8,376
cis-8,11,14-Eikosatrienová	C20:3-N6	7,471	0,360	4,823
Behenová	C22:0	3,399	0,546	16,061
Eruková	C22:1-N9	0,020	0,010	50,776
Arachidonová	C20:4-N6	23,253	1,021	4,390
cis-11,14,17-Eikosatrienová	C20:3-N3	0,096	0,049	51,634
Trikosanová	C23:0	1,263	0,183	14,489
cis-13,16-Dokosadienová	C22:2-N6	0,014	0,010	75,747
Eikosapentaenová	C20:5-N3	2,209	0,139	6,307
Lignocerová	C24:0	2,794	0,474	16,982
Nervonová	C24:1-N9	7,346	1,163	15,833
Dokosahexaenová	C22:6-N3	5,945	0,402	6,764

Tabulka 10 Aktivita enzymů (medián) u zdravých dárců v jednotlivých frakcích

Enzym	Produkt/substrát	Zdraví dárce				
		PL	DG	FFA	TG	EC
Δ^9 -desaturáza	C18:1/C18:0	0,780	1,214	2,515	9,196	13,724
Δ^5 -desaturáza	20:4N6/20:3N6	3,919	16,120	15,362	21,600	30,790
elongáza	C18:0/C16:0	0,465	0,677	0,438	0,179	0,121

Tabulka 11 Aktivita enzymů (medián) u diabetiků v jednotlivých frakcích

Enzym	Produkt/substrát	Diabetici				
		PL	DG	FFA	TG	EC
Δ^9 -desaturáza	C18:1/C18:0	0,577	0,755	2,280	7,522	8,872
Δ^5 -desaturáza	20:4N6/20:3N6	8,975	10,610	31,185	22,432	58,159
elongáza	C18:0/C16:0	0,474	0,757	0,492	0,152	0,169

Tabulka 12 Porovnání aktivit enzymů mezi diabetiky a zdravými dárci pomocí T-testu

Enzym	hladina významnosti p				
	PL	DG	FFA	TG	EC
Δ^9 -desaturáza	0,0046	0,0041	0,1015	0,0838	0,0022
Δ^5 -desaturáza	0,0020	0,7420	0,0576	0,5009	0,1674
elongáza	0,8525	0,0244	0,0495	0,1375	0,7074

Tabulka 13 Zastoupení MK ve frakci PL u diabetiků a zdravých dárců

Mastná kyselina	Diabetici			Zdraví dárci		
	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)
Myristová	0,41%	4,981	4,826	0,36%	3,699	3,983
Pentadekanová	0,20%	2,462	2,376	0,20%	2,028	2,204
Palmitová	31,07%	377,869	383,322	29,50%	301,499	314,822
Palmitolejová cis	0,78%	9,553	9,031	0,38%	4,126	2,446
Heptadekanová	0,50%	6,059	5,542	0,45%	4,527	4,430
Stearová	14,63%	178,850	177,445	13,89%	139,649	144,981
trans Elaidová	0,25%	2,968	2,961	0,34%	3,358	3,117
Olejová	9,15%	112,720	107,928	10,87%	112,169	123,269
Linoleová	18,28%	223,214	219,271	18,18%	186,503	200,469
gamma-Linolenová	0,01%	0,087	0,066	0,13%	1,252	1,422
Arachová	0,46%	5,531	5,790	0,33%	3,404	3,080
alpha-Linolenová	0,18%	2,176	2,056	0,17%	1,771	1,516
cis-11-Eikosaenová	0,15%	1,789	1,620	0,19%	1,951	1,779
cis-11,14-Eikosadienová	0,34%	4,140	4,121	0,34%	3,483	3,435
cis-8,11,14-Eikosatrienová	1,06%	12,757	12,219	2,00%	19,551	16,858
Behenová	2,34%	28,762	26,330	2,12%	21,709	22,201
Arachidonová	9,63%	119,670	114,886	8,82%	87,567	75,400
Eikosapentaenová	0,88%	11,037	9,539	0,52%	5,245	4,898
Nervonová	2,34%	27,981	28,630	2,81%	28,014	28,816
Dokosahexaenová	2,64%	33,323	31,263	3,28%	32,042	24,693

Tabulka 14 Zastoupení MK ve frakci DG u diabetiků a zdravých dárců

Mastná kyselina	Diabetici			Zdraví dárci		
	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)
Myristová	1,22%	1,541	1,382	1,00%	1,289	1,049
Pentadekanová	0,39%	0,485	0,456	0,41%	0,530	0,452
Palmitová	22,12%	27,605	26,699	19,81%	25,070	22,567
Palmitolejová cis	2,22%	2,906	2,782	1,56%	1,940	1,629
Heptadekanová	0,47%	0,583	0,547	0,36%	0,460	0,408
Stearová	16,65%	20,305	20,096	13,16%	16,416	15,087
trans Elaidová	0,26%	0,313	0,344	1,78%	2,179	2,229
Olejová	12,09%	15,818	13,475	16,73%	21,552	19,480
Linoleová	6,53%	8,353	8,040	6,71%	8,606	8,699
gamma-Linolenová	0,03%	0,036	0,034	0,25%	0,303	0,266
Arachová	0,45%	0,557	0,579	0,34%	0,424	0,371
alpha-Linolenová	0,35%	0,432	0,440	0,44%	0,549	0,486
cis-11-Eikosaenová	0,13%	0,143	0,147	1,20%	1,419	1,379
cis-11,14-Eikosadienová	0,36%	0,427	0,440	0,42%	0,517	0,475
cis-8,11,14-Eikosatrienová	0,19%	0,226	0,183	0,33%	0,390	0,355
Behenová	0,59%	0,708	0,659	0,51%	0,659	0,477
Arachidonová	2,34%	2,815	2,843	5,12%	5,981	6,057
Eikosapentaenová	0,22%	0,265	0,224	0,17%	0,201	0,194
Nervonová	0,71%	0,879	0,718	0,58%	0,754	0,681
Dokosahexaenová	0,45%	0,555	0,447	0,54%	0,646	0,585

Tabulka 15 Zastoupení MK ve frakci FFA u diabetiků a zdravých dárců

Mastná kyselina	Diabetici			Zdraví dárci		
	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)
Myristová	1,81%	4,428	4,129	2,09%	6,693	6,445
Pentadekanová	0,35%	0,816	0,732	0,32%	0,997	0,842
Palmitová	25,55%	62,354	60,009	25,90%	81,201	83,206
Palmitolejová cis	3,30%	8,204	7,908	3,44%	11,076	8,806
Heptadekanová	0,55%	1,367	1,257	0,40%	1,245	1,213
Stearová	12,74%	30,309	30,062	11,19%	33,359	33,267
trans Elaidová	0,33%	0,774	0,767	0,80%	2,296	2,080
Olejová	25,90%	65,844	59,742	26,80%	86,735	78,006
Linoleová	9,22%	23,316	21,404	0,13%	35,888	30,199
gamma-Linolenová	0,02%	0,049	0,044	0,13%	0,463	0,331
Arachová	0,25%	0,592	0,595	0,21%	0,618	0,648
alpha-Linolenová	0,81%	2,026	2,046	0,74%	2,449	1,731
cis-11-Eikosaenová	0,23%	0,587	0,487	0,40%	1,160	0,986
cis-11,14-Eikosadienová	0,31%	0,758	0,727	0,25%	0,760	0,690
cis-8,11,14-Eikosatrienová	0,04%	0,092	0,090	0,10%	0,316	0,261
Behenová	0,17%	0,408	0,422	0,15%	0,434	0,409
Arachidonová	0,95%	2,312	2,131	1,60%	4,541	4,647
Eikosapentaenová	0,23%	0,562	0,476	0,11%	0,622	0,653
Nervonová	0,19%	0,498	0,480	0,11%	0,343	0,330
Dokosahexaenová	0,48%	1,227	1,080	0,62%	1,820	1,404

Tabulka 16 Zastoupení MK ve frakci TG u diabetiků a zdravých dárců

Mastná kyselina	Diabetici			Zdraví dárci		
	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)
Myristová	2,45%	47,118	35,718	2,24%	20,914	16,263
Pentadekanová	0,33%	1353,132	4,586	0,38%	3,449	2,757
Palmitová	30,24%	478,320	421,691	25,76%	240,479	202,041
Palmitolejová cis	4,44%	71,153	58,536	4,20%	38,102	31,854
Heptadekanová	0,48%	366,070	7,003	0,40%	3,748	3,051
Stearová	4,77%	2161,515	68,349	4,78%	40,402	31,071
trans Elaidová	0,24%	4,870	3,256	0,31%	2,873	2,151
Olejová	35,78%	1300,735	539,289	37,16%	360,320	283,443
Linoleová	13,07%	215,771	176,973	14,44%	128,787	92,346
gamma-Linolenová	0,01%	115,211	0,105	0,13%	1,182	0,764
Arachová	0,35%	27,178	4,758	0,18%	1,663	1,381
alpha-Linolenová	0,90%	130,536	10,880	0,70%	7,130	3,497
cis-11-Eikosaenová	0,38%	11,059	5,485	0,38%	3,434	2,727
cis-11,14-Eikosadienová	0,16%	9,652	2,389	0,18%	1,550	1,273
cis-8,11,14-Eikosatrienová	0,05%	12,889	0,740	0,10%	0,894	0,664
Behenová	0,16%	31,361	2,415	0,12%	0,988	0,848
Arachidonová	1,24%	19,406	16,126	2,14%	15,726	12,400
Eikosapentaenová	0,20%	6,597	2,493	0,15%	1,275	1,258
Nervonová	0,13%	2,930	1,617	0,08%	0,780	0,583
Dokosahexaenová	0,38%	6,880	4,934	0,36%	2,874	1,992

Tabulka 17 Zastoupení MK ve frakci EC u diabetiků a zdravých dárců

Mastná kyselina	Diabetici			Zdraví dárci		
	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)	průměr (%)	průměr (μmol/l)	medián (μmol/l)
Myristová	0,85%	8,180	7,951	0,98%	9,232	8,984
Pentadekanová	0,15%	1,381	1,387	0,13%	1,140	1,165
Palmitová	13,72%	129,187	131,300	13,51%	125,892	123,718
Palmitolejová cis	3,90%	37,310	38,343	3,90%	38,759	42,388
Heptadekanová	0,11%	1,055	1,087	0,07%	0,666	0,423
Stearová	2,47%	22,366	21,705	2,41%	17,966	17,417
trans Elaidová	0,05%	0,480	0,463	0,04%	0,365	0,263
Olejová	20,03%	191,147	181,107	21,37%	209,903	213,264
Linoleová	42,72%	403,345	410,009	42,89%	418,253	420,094
gamma-Linolenová	0,05%	0,440	0,393	0,15%	1,240	0,836
Arachová	0,61%	5,832	5,772	0,41%	4,263	3,337
alpha-Linolenová	0,20%	1,876	1,670	0,51%	4,575	3,902
cis-11-Eikosaenová	0,21%	1,981	1,828	0,17%	1,720	0,943
cis-11,14-Eikosadienová	0,07%	0,643	0,597	0,08%	0,679	0,662
cis-8,11,14-Eikosatrienová	0,12%	1,129	1,085	0,19%	1,648	1,572
Behenová	0,36%	3,453	3,327	0,29%	2,811	2,692
Arachidonová	6,36%	60,859	60,417	5,45%	53,530	50,322
Eikosapentaenová	0,38%	3,674	2,773	0,43%	4,034	3,929
Nervonová	0,05%	0,458	0,496	0,04%	0,354	0,288
Dokosahexaenová	1,04%	9,882	10,030	1,72%	14,908	13,646