

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická**

**Stanovení lipidů v EDTA plasmě diabetiků  
s neuropatií**

**Bc. Michaela Kvapilová**

**Diplomová práce  
2009**

Zde bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Alexandru Čeganovi, CSc., slečně Ing. Michaele Elcnerové a panu prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc. za pomoc při řešení této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia.

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela KVAPILOVÁ**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

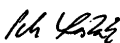
Název tématu: **Stanovení lipidů v EDTA plazmě diabetiků s neuropatií**

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

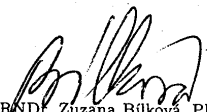
1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na lipidový metabolismus diabetiků a popište význam stanovení lipidů a mastných kyselin pro diagnostiku nemocí.
2. U diabetiků s neuropatií, bez ní a u kontrolní skupiny proveďte rozdělení EDTA plazmy do čtyř tříd (fosfolipidy, mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu) pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě a stanovte jejich koncentrace.
3. Vypočtete obsah nasycených a nenasycených mastných kyselin ve všech třídách lipidů z chromatografických záznamů plynové chromatografie.
4. Vypočtete aktivity  $\Delta$  9-desaturázy,  $\Delta$  6-desaturázy,  $\Delta$  5-desaturázy a elongázy ve všech třídách lipidů u diabetiků a kontrolní skupiny a vypracujte jejich závislosti na obsahu krevní glukózy.
5. Proveďte statistické vyhodnocení výsledků a diskutujte jejich použitelnost pro diagnostiku diabetické neuropatie.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**podle pokynu vedoucího diplomové práce**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Alexander Čegan, CSc.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Elcnerová**  
Katedra analytické chemie  
Ostatní konzultanti: **prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem zde využila jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 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 28. 4. 2009

Michaela Kvapilová

# SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá dvěma experimentálními technikami použitými pro analýzu sérových lipidů.

Jako první byla využita technika tenkovrstvé chromatografie k rozdělení lipidů ve vzorku do pěti frakcí: fosfolipidy, diacylglyceroly, triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a estery cholesterolu. Tyto frakce byly dále analyzovány pomocí druhé techniky – plynové chromatografie. Touto technikou bylo zjišťováno procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v těchto frakcích.

Bylo zjišťováno, zda se liší procentuální zastoupení jednotlivých kyselin u pacientů s diabetickou polyneuropatií, diabetem a u zdravých osob.

Po vyhodnocení výsledků můžeme říci, že jsme zjistili výraznější změny u kyseliny palmitové ve vrstvě fosfolipidů a triacylglycerolů a tato kyselina by později mohla sloužit jako diagnostický marker pro určení diabetické polyneuropatie.

**Klíčová slova:** lipidy, tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie, diabetes mellitus, diabetická polyneuropatie

# SUMMARY

This thesis deals with two experimental techniques used for analysis of serum lipids.

The first technique was used to divide the thin-layer chromatography of lipids in the sample into five fractions: phospholipids, diacylglycerols, triacylglycerols, free fatty acids and cholesterol esters. These fractions were further analyzed by the second technique - gas chromatography. This technique has been established percentage of individual fatty acids in these fractions.

It was examined whether the percentage share of individual fatty acids is different in group of patients with diabetes polyneuropathy, diabetes and healthy individuals.

After evaluating the results we can say that we found more pronounced changes in palmitic acid in a layer of phospholipids and triglycerides, and the acid could later serve as a diagnostic marker for determination of diabetic polyneuropathy.

**Keywords:** lipids, thin layer chromatography, gas chromatography, diabetes mellitus, diabetic polyneuropathy

# Obsah

1 Úvod .....	10
2 Cíl práce.....	11
3 Teoretická část .....	12
3.1 Játra.....	12
3.1.1 Struktura jater.....	13
3.1.2 Základní funkce jater.....	14
3.2 Lipidy.....	14
3.2.1 Klasifikace lipidů .....	15
3.2.2 Přehled důležitých lipidů.....	15
3.2.2.1 Mastné kyseliny.....	15
3.2.2.2 Fosfolipidy.....	16
3.2.2.3 Triacylglyceroly (Triglyceridy).....	16
3.2.2.4 Cholesterol.....	17
3.2.2.5 Lipoproteiny .....	18
3.3 Diabetes mellitus.....	21
3.3.1 Etiologie .....	21
3.3.2 Typy onemocnění.....	21
3.3.2.1 Diabetes mellitus 1. typu .....	21
3.3.2.2 Diabetes mellitus 2. typu .....	22
3.3.2.3 Gestační diabetes mellitus .....	23
3.3.3 Poruchy metabolismu lipidů u diabetes mellitus .....	24
3.3.3.1 Patofyziologie hyperlipidemie u diabetu.....	24
3.4 Polyneuropatie .....	26
3.4.1 Základní klinické projevy všech typů polyneuropatií.....	27
3.4.2 Přehled nejdůležitějších forem polyneuropatií.....	27
3.4.3 Diabetická polyneuropatie.....	29
3.4.3.1 Etiopatogeneze diabetické polyneuropatie .....	29



3.4.3.2	Klasifikace diabetické polyneuropatie .....	30
3.4.3.3	Vyšetření pacientů s diabetickou polyneuropatií.....	32
3.4.3.4	Léčba diabetické polyneuropatie .....	34
3.5	Chromatografie .....	35
3.5.1	Principy chromatografie .....	35
3.5.2	Základní typy chromatografie .....	36
3.5.2.1	Rozdělovací chromatografie.....	36
3.5.2.2	Adsorpční chromatografie .....	36
3.5.2.3	Chromatografie na měničích iontů .....	37
3.5.3	Chromatografie na tenké vrstvě .....	37
3.5.4	Plynová chromatografie .....	38
4	Experimentální část .....	40
4.1	Popis vzorků .....	40
4.2	Přístrojové vybavení a používaný materiál.....	40
4.2.1	Přístrojové vybavení.....	40
4.2.2	Používaný materiál.....	41
4.3	Metodika tenkovrstevné chromatografie .....	43
4.3.1	Extrakce lipidů ze vzorku.....	43
4.3.2	Chromatografie a identifikace kyselinou fosfomolybdenovou .....	44
4.3.3	Izolace jednotlivých složek lipidů.....	45
4.3.4	Stanovení celkových lipidů .....	45
4.4	Derivatizace – převedení na methylestery .....	46
4.5	Plynová chromatografie .....	46
5	Výsledky.....	48
5.1	Koncentrace glukózy, triacylglycerolů a cholesterolu v jednotlivých vzorcích.....	48
5.2	Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin .....	49
5.3	Grafy pro jednotlivé třídy lipidů .....	60
6	Diskuze .....	67
7	Závěr.....	70
8	Literatura .....	71

9 Přílohy .....	74
9.1 Hodnoty potřebné pro sestavení grafů 5.1 – 5.12 .....	74
9.2 Zásobní kalibrační roztok mastných kyselin.....	76
9.3 Chromatogram plazmatických mastných kyselin .....	77
9.4 Seznam tabulek , obrázků a grafů .....	78
9.4.1 Seznam obrázků .....	78
9.4.2 Seznam tabulek .....	78
9.4.3 Seznam grafů.....	79
9.4.4 Seznam zkratk .....	80

# 1 Úvod

Diabetická polyneuropatie je nejčastější mikrovaskulární komplikací provázející diabetes mellitus. Po určitém sjednocení diagnostických kritérií, akceptování subklinické a klinické formy, uvádějí literární zdroje asi 32 % prevalenci diabetické polyneuropatie jak u diabetiků 1., tak i 2. typu. Asi v 7 % je přítomna již v době stanovení diagnózy diabetu.

Dva hlavní patogenetické vlivy jsou vysvětlovány zvýšenou diabetickou glykemií. Nadbytek glukózy způsobuje hromadění vzniklého sorbitolu v nervových vláknech a následnou inhibici tvorby myoinositolu a fosfoinositolu potřebných k regeneraci fosfomyelinové nervové membrány.

Publikovaných prací zabývajících se laboratorní diagnostikou diabetické polyneuropatie není mnoho. Publikace se zabývají převážně tím, jak této nemoci předcházet. Diagnostika se opírá o 3 základní složky – anamnézu, objektivní nález neurologického vyšetření celého těla a elektrodiagnostiku.

V práci se pozornost věnuje experimentu a jeho vyhodnocení. Experiment byl prováděn na Katedře biologických a biochemických věd metodou tenkovrstvé chromatografie a metoda plynové chromatografie byla provedena na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Eberhard-Karl-Universität v Tübingenu v rámci Grantu evropské unie s názvem CARE-MAN.

Vzorky krevní plazmy pro analýzu poskytl neurologické oddělení Krajské nemocnice Pardubice.

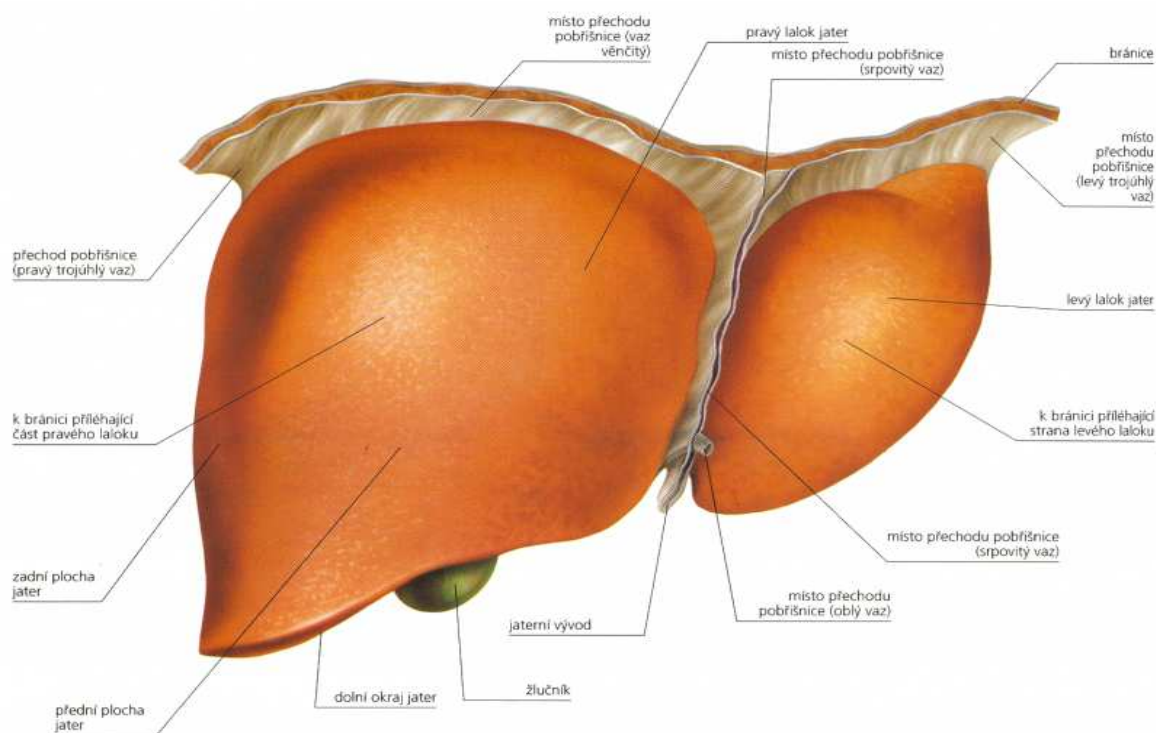
## 2 Cíl práce

Cílem práce je analyticky verifikovat metodiku chromatografického stanovení mastných kyselin ve všech třídách plazmatických lipidů se zaměřením na fosfolipidy a triacylglyceroly a porovnat jejich koncentrace u zdravých osob a u pacientů s diabetickou polyneuropatií a s diabetem. V závislosti na fyziologických nálezech neurologických vyšetření určit, zda změny v koncentracích fosfolipidů a triacylglycerolů korelují s anamnézou pacientů. Získané hodnoty vyhodnotit a navrhnout jejich diagnostické využití.

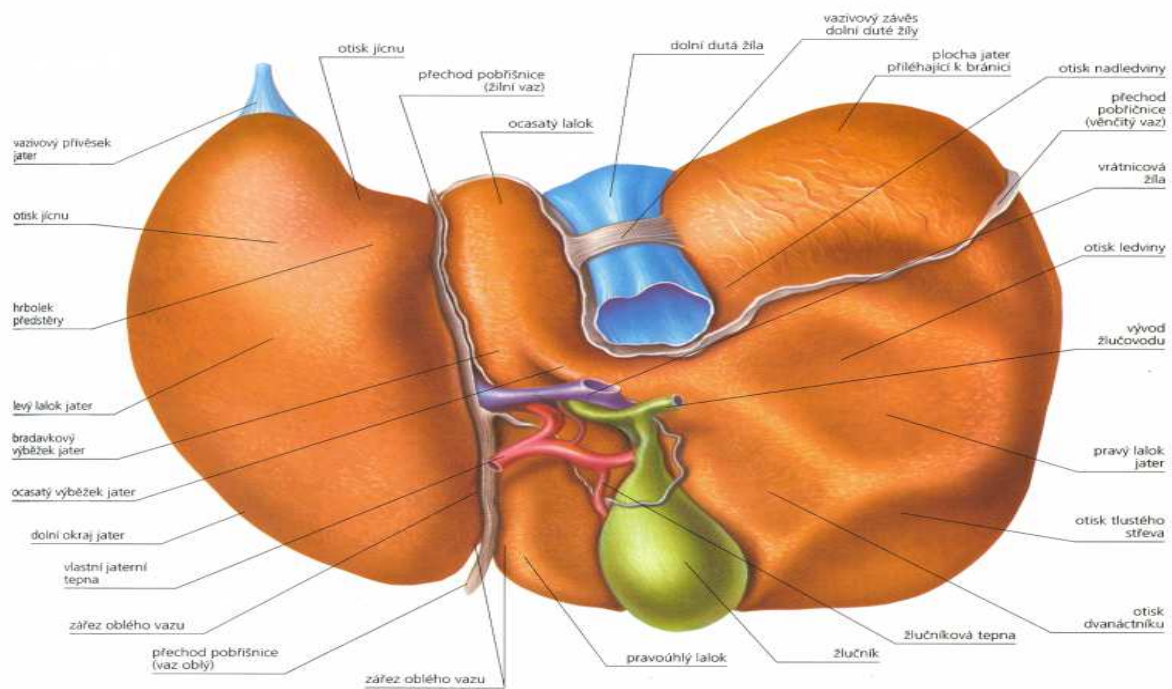
## 3 Teoretická část

### 3.1 Játra

V játrech dochází ke zpracování živin vstřebaných trávicím traktem na formu využitelnou ostatními orgány těla. Jsou největším orgánem v těle a váží asi 1,5 kg. Většina krve do nich přichází cestou vena portae a zbytek pak prostřednictvím arteria hepatica. S výjimkou chylomikronů, které jsou přenášeny lymfou, je veškerý vstřebaný materiál ve střevě transportován do jater portální žílou. K vylučování metabolitů z jater dochází pomocí žluči, která je exokrinním sekretem jater a je významná pro trávení lipidů (Junqueira a spol. 1997).



Obr. 3.1 Anatomie jater (pohled zepředu)



**Obr. 3.2 Anatomie jater (pohled zezadu)**

### 3.1.1 Struktura jater

- **Stroma** – játra jsou kryta tenkým vazivovým pouzdem, které je zesíleno v místě hilu. Sem přichází vena portae, arteria hepatica a játra v něm opouštějí pravý i levý ductus hepaticus a lymfatické cévy.
- **Jaterní lalůček** – hlavní stavební jednotkou jater je hepatocyt. Ty jsou uspořádány v plotnách a tvoří struktury, které se nazývají jaterní lalůčky. Prostor mezi tepnami je vyplněn kapilárami – jaterními sinusoidami.
- **Hepatocyty** – obsahují velké množství glykogenu. Jeho množství v játrech se mění v denním rytmu a odpovídá nutričnímu stavu jedince. Jaterní glykogen je zásobárnou glukózy a je mobilizován ihned, pokud klesne její hladina v krvi. Takto udržují hepatocyty rovnovážný stav krevního cukru (Junqueira a spol. 1997).

### 3.1.2 Základní funkce jater

- **Produkce žluči** – denně produkuje asi 600 ml. Žluč obsahuje mimo jiné i žlučová barviva a žlučové kyseliny. Má zásadní význam pro vstřebávání tuků a vitaminů rozpustných v tucích.
- **Detoxikace** – dochází zde ke konjugaci s kyselinou sírovou nebo kyselinou glukuronovou. Schopnost inaktivace některých hormonů (např. inzulin).
- **Orgán produkující teplo** – to způsobuje vysoká metabolická aktivita.
- **Glukostatická funkce** – tímto zasahují do metabolismu sacharidů. V játrech je v případě potřeby indukována glukoneogeneze, je zde zásoba glykogenu.
- **Produkce lipoproteinů typu VLDL a HDL** – probíhá zde desaturace a elongace mastných kyselin a játra se podílí zásadním způsobem na metabolismu cholesterolu (Trojan a kolektiv, 2003).

## 3.2 Lipidy

Jako lipidy označujeme skupinu buněčných složek, které si jsou podobné svou rozpustností. Rozpouští se v nepolárních rozpouštědlech (chloroform, ether, benzen). Ve vodě jsou většinou nerozpustné. Lipidy dělíme na mastné kyseliny, jednoduché lipidy, lipoproteiny a složené lipidy.

Podílí se hlavně na stavbě buněčných membrán, které jsou tvořeny převážně fosfolipidy a cholesterolem. Triacylglyceroly jsou ideálním energetickým substrátem, neabsorbujícím vodu z okolního prostředí. Tuková tkáň je ve srovnání s jinými tkáněmi lehká a současně energeticky velice bohatá. Ve vodním prostředí (v krevní plazmě) jsou lipidy transportovány ve formě lipoproteinových částic (Soška 2001).

### 3.2.1 Klasifikace lipidů

#### 1) Jednoduché lipidy

Jsou to estery mastných kyselin s různými alkoholy.

- Tuky – estery mastných kyselin s glycerolem
- Vosky – estery mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy

#### 2) Složené lipidy

Jsou to estery obsahující kromě mastných kyselin a alkoholu ještě další skupiny.

- **Fosfolipidy** – lipidy, které obsahují kromě mastné kyseliny a alkoholu ještě zbytek kyseliny fosforečné. Velmi často mohou obsahovat i dusíkaté báze a další substituenty. Dělíme je na **glycerolfosfolipidy**, zde je alkoholem glycerol a **sfingofosfolipidy**, kde je alkohol sfingosin.
- **Glykolipidy (glykosfingolipidy)** – lipidy, které obsahují mastnou kyselinu, sacharidovou složku a sfingosin.
- **Ostatní složené lipidy** – sulfolipidy a aminolipidy. Můžeme sem zařadit i lipoproteiny.

#### 3) Prekurzory a odvozené lipidy

Do této skupiny patří mastné kyseliny, glycerol, steroidy, alkoholy včetně glycerolu a sterolů, mastné aldehydy a ketolátky, uhlovodíky, v tucích nerozpustné vitaminy a hormony.

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

### 3.2.2 Přehled důležitých lipidů

#### 3.2.2.1 Mastné kyseliny

Představují základní stavební kameny živé hmoty. Mohou být nasycené nebo nenasyčené karboxylové kyseliny s uhlíkovým řetězcem od 2 do 36 atomů. U vyšších živočichů a rostlin dominují mastné kyseliny (FA) se 16 a 18 uhlíkovými atomy, tj.



kyseliny palmitová, stearová, olejová a linolová. Asi polovina FA je nenasycených s 1-6 dvojnými vazbami, více nenasycené FA (PUFA) jsou charakterizovány pentadienovým uspořádáním dvojných vazeb (Tvrzická a spol. 2009).

Přítomnost nenasycené vazby podmiňuje existenci prostorových izomerů: směřují-li uhlíkové řetězce na protilehlých stranách této vazby jedním směrem, jedná se o **cis-izomerii**, směřují-li na opačné strany, jedná se o **trans-izomerii**. Pro nenasycené mastné kyseliny přirozených lipidů je typická cis-forma.

Lidský organismus si mastné kyseliny umí vytvořit sám. Syntéza probíhá v játrech. Jedinými nezbytnými kyselinami, které potřebujeme, ale neumíme si je syntetizovat jsou kyseliny linolová, linolenová a arachidonová (esenciální FA). Základem syntézy FA je **acetyl-CoA**, který vzniká ze sacharidů, aminokyselin i odbouráváním jiných FA. Odbourávání FA se děje katabolickým procesem – **beta-oxidací** (Štern a spol. 2005).

### 3.2.2.2 Fosfolipidy

Jsou to sloučeniny kyseliny fosforečné s glycerolem a s dalšími látkami (např. serinem, cholinem). Jsou lokalizovány na rozhraní lipidové a vodní fáze, protože skupina kyseliny fosforečné je hydrofilní, opačný konec molekuly je hydrofobní. Díky tomu mají nezastupitelnou roli v buněčných membránách a na povrchu lipoproteinů. Nejčastěji vyskytující se fosfolipidy (PL) jsou fosfatidylcholin (lecitin) a sfingomyelin. Lecitin je obsažen hlavně v buněčných membránách a sfingomyelin v nervové tkáni. Oba jsou zastoupeny v lipoproteinech, kde umožňují transport triglyceridů a esterifikovaného cholesterolu ve vodném prostředí.

Syntéza PL probíhá ve všech tkáních, krevní fosfolipidy se syntetizují především v játrech (Soška, 2001).

### 3.2.2.3 Triacylglyceroly (Triglyceridy)

Jsou základní složkou živočišných a rostlinných tuků a olejů. Jsou to látky vznikající vazbou 3 mastných kyselin na glycerol. Na prvním uhlíku je většinou vázaná kyselina palmitová, na druhém kyselina linolová a na třetím kyselina olejová. Syntéza triacylglycerolů probíhá především v játrech (v menší míře také v enterocytech). Hlavním zdrojem dvouuhlíkatých štěpů pro syntézu mastných kyselin je hlavně glukóza. Zvýšená koncentrace triacylglycerolů v krvi je způsoben nadměrným příjmem energie v potravě. Ke

štěpení triacylglycerolů v tukové tkáni dochází účinkem hormon-senzitivní lipázy. Tento enzym je inhibován inzulinem a je aktivní pouze při nízké koncentraci inzulinu (Soška, 2001; Voet, Voetová, 1995).

#### **3.2.2.4 Cholesterol**

Cholesterol je významnou složkou živočišných plazmatických membrán a v menší míře se vyskytuje také v membráně vnitrobuněčných organel. Jeho původ je buď endogenní (syntéza) nebo exogenní (potrava). Syntézy cholesterolu je schopna každá živočišná buňka. Syntéza probíhá především v hepatocytech, v nervové tkáni a v enterocytech. Cholesterol je důležitou látkou určující vlastnosti membrán a je ve velkém množství přítomen v lipoproteinech. Je to prekurzor steroidních hormonů.

V organismu existuje ve dvou formách: volný a esterifikovaný (má navázanou mastnou kyselinu na jeho OH skupině).

- **Volný cholesterol**

Je jednou ze základních součástí všech živočišných buněk. Jeho základní biologické funkce:

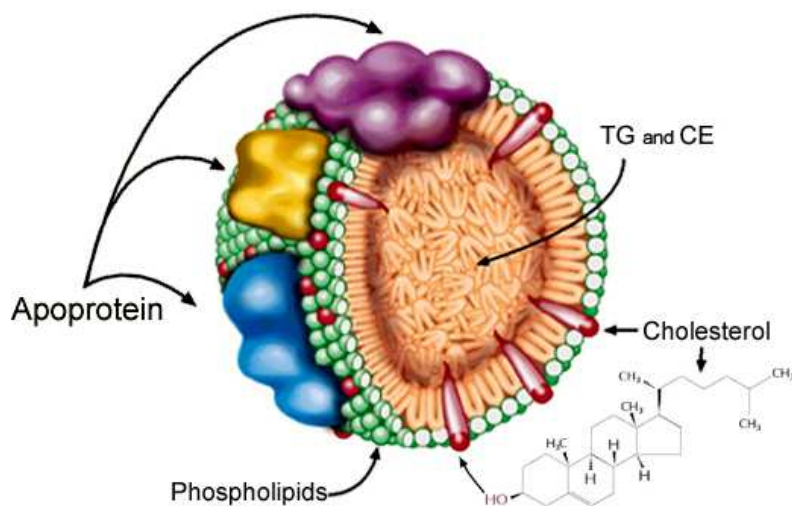
- Je výchozí látkou pro syntézu steroidních hormonů.
- Je výchozí látkou pro syntézu žlučových kyselin.
- Je nezbytný pro syntézu všech lipoproteinů ve střevě a játrech, je základní součástí povrchové struktury všech lipoproteinů. Bez cholesterolu by nebyla možná resorpce triacylglycerolů a v tucích rozpustných vitaminů ze střeva, jejich transport a utilizace. Proto musí být secernován do žluče.

- **Esterifikovaný cholesterol**

Aby mohl být cholesterol transportován v lipoproteinech a uložen v buňkách, musí být nejprve esterifikován → je transportní a zásobní formou cholesterolu. Je transportován uvnitř lipoproteinových částic a jeho zásoba je především v hepatocytech (Soška, 2001; Voet, Voetová, 1995).

### 3.2.2.5 Lipoproteiny

Lipidy jsou v plazmě transportovány ve vazbě na bílkoviny a takto vzniklé částice se nazývají lipoproteiny. V jejich jádře se nacházejí nepolární triacylglyceroly a esterifikovaný cholesterol. Na povrchu jsou více polární lipidy – volný cholesterol, fosfolipidy a apoproteiny.



Obr. 3.3 Obecný obrázek lipoproteinu

#### • Metabolismus lipoproteinů

Exogenní triacylglyceroly a cholesterol jsou transportovány v **chylomikronech**. Tyto lipoproteiny jsou největší, mají nejvyšší podíl lipidů a nejnižší hustotu. Vznikají ve sliznici tenkého střeva odkud se dostávají do krevního oběhu. Nejdůležitějším apoproteinem pro syntézu chylomikronů je apoB-48. V krevním oběhu se setkávají s lipoproteinovou lipázou, která štěpí triacylglyceroly v chylomikronech (Racek a spol., 2006).

Aktivátorem lipoproteinové lipázy je apoprotein CII, který je přítomen na povrchu VLDL, inhibítorem je apoprotein CIII. Za fyziologických okolností je vrchol koncentrace chylomiker asi za 3-6 hodin po jídle, jejich biologický poločas je asi 1/2 hodiny a po 9 hodinách jsou úplně odbourány (Soška, 2001).

Uvolněné mastné kyseliny mohou sloužit jako zdroj energie pro svaly a jiné tkáně, ukládají se v tukové tkáni ve formě zásobních triacylglycerolů nebo jsou vychytávány játry a metabolizovány a nebo využity k resyntéze triacylglycerolů. Po hydrolyze většiny triacylglycerolů zbudou z chylomikronů malé částice obsahující hlavně cholesterol tzv. **remnants**. Ty jsou z oběhu odstraněny játry (Racek a spol., 2006).

**Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)** jsou hlavně tvořeny v játrech. Základním apoproteinem je apoB-100. V hladkém endoplazmatickém retikulu přibírá endogenní triacylglyceroly a malé množství esterů cholesterolu. Prostřednictvím Golgiho aparátu jsou vezikuly s částicemi secernovány do krve. V plazmě tato forma VLDL přibírá z lipoproteinů o velké hustotě (HDL) estery cholesterolu, apoC a vznikají zralé VLDL, které pomocí lipoproteinové lipázy ztrácejí triacylglyceroly. Fosfolipidy, apoC a část apoE jsou přeneseny do HDL a z lipoproteinů VLDL vznikají **lipoproteiny o střední hustotě (IDL)**.

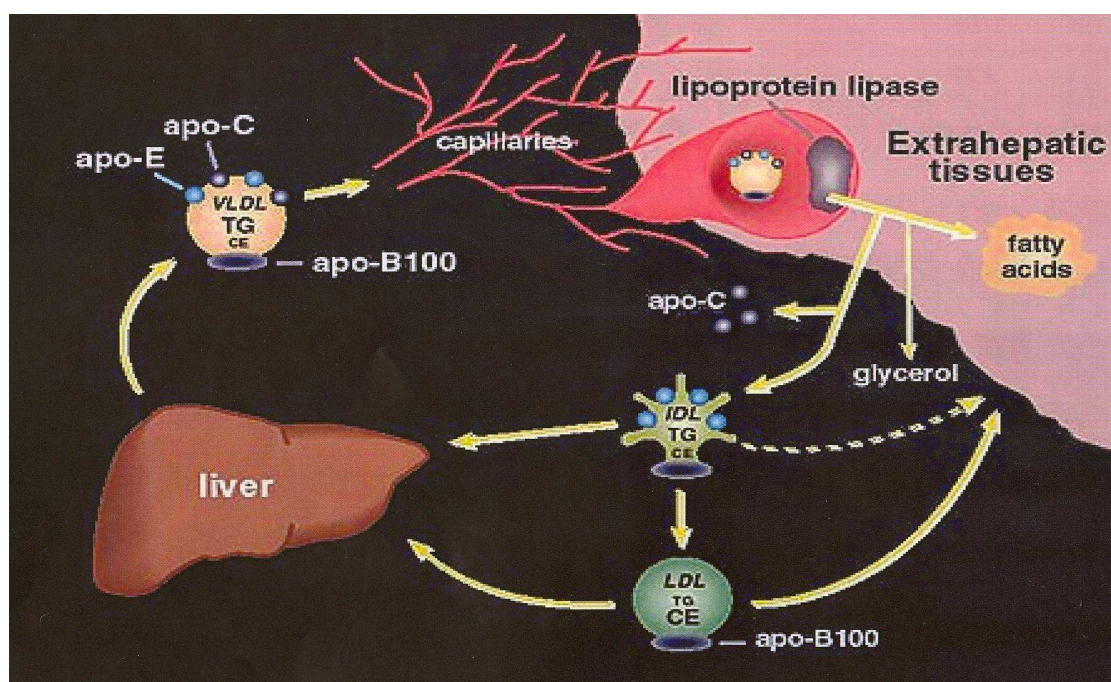
Lipoproteiny o střední hustotě obsahují ve srovnání s VLDL větší podíl triacylglycerolů. Ten vzrostl díky hydrolyze triacylglycerolů i absolutně přenosem esterů cholesterolu z HDL (Racek a spol., 2006).

Na svém povrchu nesou apoE a apoB-100. Za fyziologických okolností mají velmi krátký biologický poločas a jejich koncentrace normálně nepřesahuje 1/10 koncentrace LDL. Jsou metabolizovány dvojným způsobem: Buď jsou vychytávány receptorem pro apoprotein E, který je totožný s receptorem pro chylomikronové remnanty a degradovány jsou hlavně v játrech, nebo je část IDL vystavena účinku jaterní lipázy a ta z nich odštěpuje další část triacylglycerolů a vznikají z nich v játrech LDL (Soška, 2001).

**Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)** mají jako hlavní funkci přenos cholesterolu do periferních tkání. Jejich jádro totiž obsahuje téměř výlučně cholesterol a povrch je tvořen fosfolipidy, volným cholesterolem a apoproteinem B-100 (Racek a spol., 2006).

Periferní tkáně nejsou na dodávce cholesterolu závislé, protože ho umí syntetizovat. Fyziologická koncentrace LDL u člověka (do 3 mmol/l) je mnohem větší, než je skutečná potřeba cholesterolu v buňkách. Do buněk vstupují částice LDL přes LDL receptory a jejich ligandem je apoprotein B-100. LDL receptory buňka syntetizuje při nedostatku cholesterolu, receptor migruje na povrch buňky a naváže LDL částici z krve. Potom je celý komplex internalizován, cholesterol z buňky uvolněn a LDL receptor může znovu migrovat na povrch buňky. LDL mají dlouhý biologický poločas a část z nich podléhá chemické modifikaci - glykaci nebo oxidaci (Soška, 2001).

Posledním typem jsou **lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL)**. Ty jsou ze všech lipoproteinů nejmenší a vznikají jako nascentní HDL v játrech a v tenkém střevě. Mají diskoidní tvar a jsou tvořeny dvojvrstvou fosfolipidů a apoproteiny A-I, A-II a E. Jejich funkcí je přijímání volného cholesterolu z buněčných membrán i z jiných typů lipoproteinů. Volný cholesterol je v částici esterifikován a estery cholesterolu se hromadí v jádře HDL. Tento děj katalyzuje enzym lecitin-cholesterolacyltransferáza (LCAT). Nejmenší sférické částice HDL se označují jako HDL<sub>3</sub>, jejich obohacením o další cholesterol se mění na HDL<sub>2a</sub>. Z těchto částic výměnou cholesterolu za triacylglyceroly z VLDL vznikají HDL<sub>2b</sub>, které se po hydrolyze jaterní lipázou mění znovu na HDL<sub>3</sub>. Přenos cholesterolu z HDL<sub>2a</sub> na VLDL zajišťuje bílkovina cholesteryl-ester transfer protein (CEPT). Takto se přebytečný cholesterol z buněčných membrán přes HDL dostává do VLDL a vrací se to jater vychytáváním IDL nebo LDL (Racek a spol., 2006).



Obr. 3.4 Lipoproteinový metabolismus

## 3.3 Diabetes mellitus

### 3.3.1 Etiologie

Za diabetes mellitus není zodpovědná mutace jediného genu s dominantním nebo recesivním dědičným přenosem, ale jde o multifaktorový způsob dědičného přenosu. Vystupuje při tom více změn genetických informací, které vedou k manifestaci nemoci až v kombinaci a ve spojení s exogenními vlivy (Karlson a spol., 1982).

### 3.3.2 Typy onemocnění

Diabetes mellitus není jednotné onemocnění. Podle etiologie ho lze rozdělit na: diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, gestační diabetes mellitus a ostatní specifické typy diabetu.

#### 3.3.2.1 Diabetes mellitus 1. typu

Obvykle se označuje jako IDDM (diabetes mellitus závislý na inzulínu). Postihuje většinou mladé lidi. Jedná se o skutečný defekt tvorby inzulínu, vyvolaný postupnou destrukcí beta-buněk Langerhansových ostrůvků. Za příčinu se považuje autoimunitní proces, vyprovokovaný virovým onemocněním či chemickou modifikací těchto buněk u jedinců s diabetickou predispozicí. Na destrukci beta-buněk pankreatu se nepochybně podílejí i volné radikály, resp. reaktivní formy kyslíku. Nemocní mají sklon k rozvoji ketoacidózy (Racek a spol., 2006).

Během posledních dvou dekad se zjistilo, že hlavní formou diabetu závislého na inzulínu je imunitní etiologie, že nemoc vzniká v jakémkoli věku a že pacienti nejsou zcela závislí na inzulínu v časných stádiích nemoci. Podle Americké diabetologické asociace došlo k rozdělení diabetu 1. typu na dva typy:

- **Typ 1A** – je imunitně zprostředkovaná forma a je charakterizována přítomností protilátek proti ostrůvkům a zánětem pankreatu s destrukcí ostrůvkových beta-buněk. Vždy progreduje k těžkému inzulínovému deficitu. Je spojen s mnoha jinými imunologicky podmíněnými chorobami (Addisonova choroba, celiakie, autoimunitní tyreoidita, perniciózní anemie).

### ***Stadia vývoje:***

- Genetická dispozice
  - Spouštěcí zóna
  - Aktivní autoimunita
  - Ztráta inzulínové sekrece
  - Zjevný diabetes
  - IDDM
- **Typ 1B** – je určen pro formy diabetu s těžkým inzulínovým deficitem bez známek autoimunity (Rybka, 2007).

### **3.3.2.2 Diabetes mellitus 2. typu**

Obvykle se označuje jako NIDDM (diabetes mellitus nezávislý na inzulínu), i když nezávislost na dodávce inzulínu není pravidlem. NIDDM je nejčastější metabolickou poruchou vyznačující se rezistencí na inzulín nebo relativním nedostatkem inzulínu, který vede v organismu k nedostatečnému použití glukózy. Rezistence je způsobena buď snížením počtu receptorů nebo postrecepční blokádou. Do této skupiny patří až 90% diabetiků. Na rozdíl od diabetu 1. typu se nejedná o zánik schopnosti beta-buněk slinivky břišní syntetizovat inzulín. Základní diagnostickou poruchou je nerovnováha mezi sekrecí a účinkem inzulínu v metabolismu glukózy. Jde o kombinaci obou poruch:

- a) Porušené sekrece inzulínu.
- b) Působení inzulínu v cílových tkáních, přičemž kvantitativní podíl obou poruch může být rozdílný. Není tak jasné, která odchylka je primární, ale nezbytným předpokladem je přítomnost obou poruch. Na vzniku choroby se podílejí i genetické vlivy a exogenní faktory.

Mezi nejdůležitější exogenní faktory patří:

- nadměrný příjem kalorií
- nevhodné složení stravy
- nedostatečná fyzická aktivita
- obezita
- kouření a jiné civilizační návyky

Postižení bývají spíše starší lidé, často obézní (při redukci tělesné hmotnosti dochází k výraznému zlepšení metabolismu glukózy, resp. snížení inzulínové rezistence) (Rybka, 2007; Racek a spol., 2006).

U diabetiků je dvakrát až třikrát vyšší riziko infarktu myokardu než u nediabetiků. Toto zvýšené riziko se týká i pacientů se syndromem inzulínové rezistence. Hyperlipidemie u diabetiků je velmi zásadním, ale ovlivnitelným rizikovým faktorem. Diabetes mellitus 2. typu je charakterizován těmito odchylkami v plazmatickém lipidovém spektru:

- zvýšená hladina triacylglycerolů nalačno i po jídle
- snížená koncentrace HDL-cholesterolu
- výskyt malých, denzních LDL-lipoproteinů při zpravidla normální nebo jenom lehce zvýšené koncentraci LDL-cholesterolu (Kraml, Syrovátka, 2004).

### **3.3.2.3 Gestační diabetes mellitus**

Jde o jakýkoli stupeň glukózové intolerance s prvními projevy během těhotenství, nejčastěji během 20. týdnu, a úpravou po porodu. Výskyt v populaci je asi 2-3 %. Pravidlem bývá inzulínová rezistence, která v průběhu těhotenství stoupá a maxima dosahuje mezi 24. a 30. týdnem těhotenství, kdy se nejčastěji gestační diabetes mellitus (GDM) manifestuje.

Antiinzulární efekt mají placentární hormony, hlavně kortizol a humánní placentární laktogen (Rybka, 2007).

Během těhotenství dochází k celkovému ovlivnění sacharidového metabolismu. V organismu stoupá několikanásobně hladina různých steroidů, prolaktinu a dalších hormonů. V těhotenství se mění (klesá) aktivita glukózového transportéru GLUT4, klesá stimulační účinek glukózy na sekreci inzulínu. Poruchy sekrece inzulínu předcházejí podle Ryana (1995) poklesu glukózové tolerance. Na těchto změnách se kromě hormonálních faktorů podílí i pokles saturace některými ionty (Mg, K, Cl) i vitaminy (pyridoxinem). Také ale předpokládá, že GDM vzniká pouze při současně poruše funkční kapacity beta-buněk Langerhansových ostrůvků. Je nesporné, že i lehká forma gestačního diabetu nepříznivě ovlivňuje vývoj plodu, a to nejen intrauterinní, ale i vznik diabetu v dalším průběhu života. Při dlouhodobém pozorování postižených žen se ukazuje, že u části přetrvává porucha glukózové tolerance, přičemž u menší části vzniká diabetes mellitus 1.



typu, u větší části diabetes mellitus 2. typu a u části dochází k plné normalizaci glukózové tolerance (Zamrazil a spol., 1997).

### **3.3.3 Poruchy metabolismu lipidů u diabetes mellitus**

Diabetes 2. typu a inzulínová rezistence souvisejí se vzájemným propojením vztahu plazmatických lipidů a lipoproteinových abnormalit. Tyto abnormality zahrnují pokles HDL-cholesterolu, převahu LDL částic a zvýšení hladiny triacylglycerolů. Rostoucí jaterní sekrece VLDL částic bohatých na triacylglyceroly a snižující se odbourávání VLDL se považuje za hlavní závažnost v patofyziologii dyslipidemií (Krauss, 2004).

Mezi významné vlivy, které jsou pro patogenezi hyperlipoproteinémií u diabetiků typické, řadíme schopnost inzulínu regulovat syntézu VLDL v játrech. Inzulín zvyšuje odbourávání apoB v cytosolu, a proto stavy, kdy je inzulínu málo, nebo kdy je nefunkční, vedou k nárůstu koncentrace tohoto apoproteinu. Inzulín také snižuje syntézu proteinu MTP (microsomal triglyceride transfer protein), jehož úkolem je mikrozomální transfer triacylglycerolů (Perušičová, Anděl, 1999).

#### **3.3.3.1 Patofyziologie hyperlipidemie u diabetu**

##### **➤ *Hypertriacylglycerolemie***

U pacientů s NIDDM Dochází v tukové tkáni v důsledku nedostatečné senzitivitě k inzulínu ke snížení aktivity lipoproteinové lipázy (LPL) a naopak k odblokování aktivity hormon-senzitivní lipázy. To má za následek sníženou hydrolýzu triacylglycerolů obsažených v cirkulujících VLDL (a chylomikronech), a také zvýšený tok volných mastných kyselin z tukové tkáně do jater. K nadprodukcii VLDL v játrech dochází zřejmě v důsledku hyperinzulinemie. Inzulín má důležitou roli v regulaci syntézy triacylglycerolů a VLDL, a to především díky aktivaci nukleárních transkripčních faktorů SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein). SREBP-1c je přítomný v játrech i v tukové tkáni a je zodpovědný za syntézu mastných kyselin, triacylglycerolů a VLDL.

Můžeme ji tedy vysvětlit jako zvýšenou syntézu VLDL na jedné straně a zhoršením odsunu triacylglycerolů z VLDL a chylomikronů do periferních tkání na straně druhé (Vrablík, Češka, 2003).

➤ ***Nízký HDL-cholesterol***

Hlavní funkcí HDL je reverzní transport cholesterolu z periferních tkání do jater. U pacientů s diabetem nestačí částice HDL3 vyžrát v objemnější HDL2a, jelikož je ihned po vyplavení do periferie vystavena častější interakci s objemnějšími VLDL (bohatými na triacylglyceroly), které cirkulují v plazmě ve zvýšené koncentraci (jak již bylo uvedeno dříve). HDL3 resp. malé HDL2a začne příliš brzy směňovat relativně malé množství cholesterolových esterů za triacylglyceroly. To následně zabrání ukládání dalších cholesterolových esterů v jádru takové HDL-částice. V játrech hydrolyzuje hepatální lipáza triacylglyceroly na HDL už při jejich malém množství. Část HDL je játry přímo vychytávána a zbylé částice se vracejí zpět do cirkulace jako HDL3. Nízký HDL-cholesterol u diabetiků je tedy způsoben sníženou transportní kapacitou HDL pro triacylglyceroly, ale zároveň vyšší frakční clearance HDL v játrech, která rovněž vede ke snížené koncentraci HDL-částic (Kraml, Syrovátka, 2004).

➤ ***Poruchy u diabetes mellitus 1. typu***

U IDDM vede nedostatek inzulínu k poklesu aktivity lipoproteinové lipázy a k zvýšení aktivity endogenní lipázy v tukové tkáni. Důsledkem je zvýšení přísunu volných mastných kyselin do jater a růst koncentrace VLDL v játrech. Zvýšeny jsou také glykace a peroxidace lipoproteinů (Perušičová, Anděl, 1999).

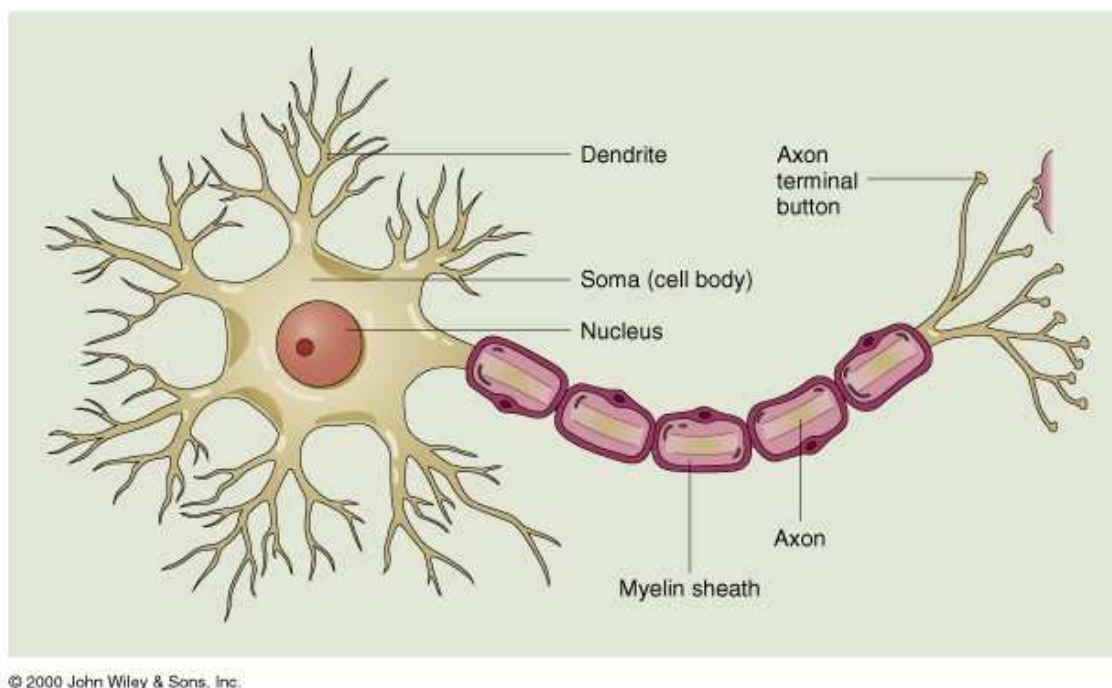
Lipidový profil pacienta s IDDM je většinou ovlivňován glykemií. Jestliže je glykémie v normálních hodnotách, lipidové spektrum je většinou stejné jako u osob bez diabetu. Studie ukázaly, že u osob s dobře léčeným diabetem 1. typu byly hladiny lipidů a lipoproteinů velmi podobné hodnotám osob bez diabetu. Mírné rozkolísání glykémie je spojeno s pouhým vzestupem sérových triacylglycerolů, ale neprojevují se rozdíly v hladinách LDL a HDL. Špatná kontrola diabetu se závažným inzulínovým deficitem a diabetickou ketoacidózou je často spojena

s výraznou hypertriacylglycerolemií, kvůli snížené aktivitě lipoproteinové lipázy. Při zahájení inzulínové terapie se hladina triacylglycerolů vrací k fyziologickým hodnotám (Szabó, 2001).

### 3.4 Polyneuropatie

Nejčastěji se v populaci vyskytuje diabetická polyneuropatie. Mezi další nejčastější příčiny polyneuropatií patří: alkohol, borrelióza, neoplazmata, chemoterapie, renální insuficience, hepatální léze, arterioskleróza a dlouhodobé podávání některých farmak.

Polyneuropatie postihují především axon i myelin současně a jednotlivé typy polyneuropatií se liší stupněm postižení axonu a myelinu (např. etylická neuropatie má v počátku onemocnění dominantní postižení axonu a relativně malé postižení myelinu, nejčastější diabetická polyneuropatie má postižení převážně axonální na rozdíl od vzácné difterické, která postihuje prakticky jen myelin). U polyneuropatií postihujících myelin, jsou zjišťovány protilátky proti glykoproteinu a u polyneuropatií postihujících axon se objevují protilátky proti sulfatidům (Bartoušek, 2002).



Obr. 3.5 Struktura neuronu

### 3.4.1 Základní klinické projevy všech typů polyneuropatií

Pro všechny typy polyneuropatií je společný pomalý začátek potíží, které trvají tak dlouho, dokud není odstraněna příčina polyneuropatie. Potíže začínají většinou na dolních končetinách a mají ponožkovitý typ poruchy cití a postižení akrálních svalů a teprve s odstupem času se začnou objevovat na horních končetinách rukavicovou poruchou cití a slabostí akrálních svalů.

1. **Iritační senzitivní projevy** – objevují se různé poruchy citlivosti od mravenčení, brnění nebo pálení až po bolesti.
2. **Zánikové senzitivní příznaky** – dostavuje se snížená citlivost na zevní smyslové podněty (hypestezie) až po znecitlivění, ztrátu vnímání dotyku, bolesti a tepelných změn, snížení hluboké citlivosti (pallhypestezie) až vymizení hluboké citlivosti (pallanestezie).
3. **Iritační motorické příznaky** – projevují se stažením svalů až bolestivými křečemi, především na dolních končetinách.
4. **Zánikové motorické příznaky** – šlachookosticová hypo až areflexie, především na okrajích dolních končetin, částečné ochrnutí svalů častěji na dolních končetinách.

### 3.4.2 Přehled nejdůležitějších forem polyneuropatií

#### 1. Polyneuropatie u endokrinních chorob

- **Diabetická polyneuropatie** – vyskytuje se nejčastěji (podrobně popsána v kapitole 3.4.3).
- **Hypotyreotická polyneuropatie** – vyskytuje se velmi málo, postihuje axon i myelin.

#### 2. Metabolické endotoxické polyneuropatie

- **Uremická polyneuropatie** – její výskyt se zvyšuje úměrně s narůstajícím počtem dialyzovaných pacientů, u kterých se vyskytuje velmi často. Jedná se o velmi těžké postižení axonu i myelinu s výraznými atrofiemi okrajových svalů.

- **Hepatická polyneuropatie** – klinický výskyt má střední frekvenci. Jedná se o postižení axonu i myelinu. U pokročilých jaterních lézí při jaterním selhávání může dosahovat až těžkého stupně.
  - **Porfyrická polyneuropatie** – je velmi vzácná. Můžeme ji prokázat biochemicky stanovením porfobilinogenu v moči během záchvatu.
  - **Amyloidová polyneuropatie** – vyskytuje se také velmi vzácně. Postihuje axon i myelin.
3. **Polyneuropatie při malnutrici** – v ČR vzácná a vyskytuje se prakticky jen u toxikomanů, kde je vždy v kombinaci s exotoxickou polyneuropatií. Velmi vzácně doprovází těžké formy anorexií. Jde o těžké postižení axonů i myelinu s výraznými atrofiemi okrajových svalů.
  4. **Polyneuropatie při malabsorpčních chorobách** – vzácná, vyskytuje se u stavů po rozsáhlých resekcích žaludku a při perniciózním typu gastritidy. Imunologickými mechanismy zde dochází k blokadě vazby vitamínu B<sub>12</sub> na vnitřní faktor znemožňující jeho resorpci.
  5. **Polyneuropatie aterosklerotická a involuční** – výskyt je častý u nemocných seniorů, ale před určením diagnózy se musí vyloučit jiná příčina neuropatie, která je častá ve vyšším věku (diabetes mellitus, malignita, Borrelie, alkohol a jiné). Jedná se o lehké neuropatie s postižením axonu i myelinu.
  6. **Polyneuropatie při kolagenózách** – výskyt je malý a postihuje axon i myelin.
  7. **Polyneuropatie paraneoplastické** – vyskytují se často. Doprovází téměř všechny malignity a je potencována cytostatickou léčbou.
  8. **Polyneuropatie exotoxické**
    - **Polyneuropatie při chronickém etylizmu** – v našich podmínkách se vyskytuje velmi často. Postihuje pouze axony a projevuje se to atrofiemi distálních svalů na dolních končetinách. K diagnostice můžeme použít vyšetření karbohydrát deficientního transferinu (CDT), které je specifické pro chronickou konzumaci alkoholu a po nárazové konzumaci se nezvyšuje. Na patogenezi se výrazně podílí deficit vitamínu B<sub>1</sub>.

- *Polyneuropatie při dlouhodobém podávání farmak* – jsou téměř pravidelnou komplikací léčby cytostatik a častou komplikací léčby kombinacemi sulfonamidů a trimethoprimu u infekcí močových cest.
  - *Polyneuropatie při otravě olovem, arzénem a organickými rozpouštědly* - jsou velmi vzácné.
9. **Polyneuropatie séogenetické (postvakcinační)** – objevuje se vzácně. Postihuje axon i myelin.
10. **Polyneuropatie při borrelióze** – vyskytuje se velmi často a postihuje axon i myelin. Postižení může být až středně těžkého stupně (Bartoušek, 2002).

### 3.4.3 Diabetická polyneuropatie

Diabetická polyneuropatie je nejčastější mikrovaskulární chronickou komplikací doprovázející diabetes mellitus. Dlouhou dobu byl klinický význam tohoto onemocnění podceňován, ale v současnosti se ví, že diabetická polyneuropatie zvyšuje u pacientů morbiditu i mortalitu.

U diabetika dochází k rozvinutí nezánnětlivého postižení periferních nervů a současně není objevena jiná příčina tohoto postižení. Postižení při diabetu začíná od akrálních částí především dolních končetin. Periferní nerv se skládá z různě silných vláken, která plní různé funkce. Motorická vlákna jsou nejsilnější a mají pohybovou funkci. Senzitivní vlákna se liší: slabší vlákna reagují na dotyk, ještě tenčí jsou pro bolestivé a termické cítění a poté silná vlákna, která slouží pro hlubokou citlivost (polohocit, pohybovit a vnímání vibrací). Právě tato vlákna bývají postižena v počátečních stádiích diabetické polyneuropatie. Vegetativní vlákna inervují jednotlivé vnitřní orgány, ale také cévy zásobující jednotlivé periferní nervy (Olšovský, 2006).

#### 3.4.3.1 Etiopatogeneze diabetické polyneuropatie

I přes to, že etiopatogeneze není zcela přesně známá, se za nejzávažnější faktor považuje dlouhodobá hyperglykemie, ale podílí se na ní také další metabolické poruchy s vlivy genetickými i exogenními a angiopatie – ischemie.

Mechanismy uplatňující se v etiopatogenezi diabetické polyneuropatii můžeme rozdělit do několika okruhů, které se vzájemně ovlivňují a jejich podíl na vzniku choroby je různý:

- Zvýšená aktivita polyolové cesty při zvýšené aktivitě enzymu aldoreduktázy s hromaděním sorbitolu a fruktózy v nervech a následným zvýšením vychytávání myoinositolu.
- Změny v aktivitě membránové Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPázy a poruchy intracelulárního přenosu signálu způsobené hyperglykemií vedou k poruše funkce nervu.
- Snížení tvorby důležitého neuromodulačního a vazodilatačního produktu NO – oxidu dusnatého a metabolismu prostaglandinů. Uplatňuje se i neenzymová glykace proteinů s tvorbou konečných produktů glykace na uvolňování volných kyslíkových radikálů v endoneurálních kapilárách.
- Oxidační stres vede ke zvýšeným hladinám superoxidových anionových radikálů a peroxidaci lipidů, snížení kapacity antioxidačního systému k aktivaci proteinkinázy C a vazokonstričních radikálů.
- Ovlivnění vazoaktivních faktorů vedoucích k vaskulární dysfunkci, k poškození mikrovaskulatury nervu a ischemii nervu. Při této poruše se uplatňuje i porucha metabolismu esenciálních mastných kyselin s následným snížením tvorby vazodilatačních prostaglandinů.
- Porucha růstových – neurotrofických faktorů: nervového růstového faktoru a růstových faktorů podobných inzulinu, např. IGF-I,II (Rybka, 2007).

### 3.4.3.2 Klasifikace diabetické polyneuropatie

Diabetická polyneuropatie prošla mnoha klasifikacemi. První klasifikaci v historii zavedl už v roce 1893 Leyden, který rozlišoval 3 formy: První byla symetrická neuralgicko-parestetická forma, druhá paretická a třetí ataktická s parestézemi v nohách. Další klasifikace z roku 1893 podle Pryce dělí diabetickou polyneuropatii na dvě formy – motorickou a senzitivní. Během dalších let dochází k ještě mnoha klasifikacím. Pro klinickou praxi je např. vhodná pro svou jednoduchost a přehlednost klasifikace dle Asburyho a Browna z roku 1982. Velmi praktická klasifikace diabetické polyneuropatie pochází z roku 1987 od Dycka, Karnese a O'Briena. Tato klasifikace je založena na symetričnosti a asymetričnosti nervového postižení. Tato klasifikace dělí neuropatie do čtyř skupin a jako 5. skupina je přidána autonomní neuropatie (Bartoušek, 2001).

## **I. Symetrické distální polyneuropatie**

Tento typ je mezi diabetiky zastoupen nejčastěji. Klinicky se projevuje především senzitivními projevy na dolních končetinách a na počátku choroby postihuje motorický neuron méně. Při delším trvání polyneuropatie dochází i k postižení horních končetin, které není tak výrazné. Objevuje se především u diabetu 1. typu, ale může být i prvním příznakem diabetu 2. typu. Dochází k degeneraci tenkých nervových vláken. V neurologickém nálezu bývají zachovány šlachosvalové reflexy na dolních končetinách. Může docházet k porušení citlivosti pro teplo a bolest a svaly na dolních končetinách mívají snížený svalový tonus.

## **II. Asymetrické proximální polyneuropatie**

Poprvé se o ní zmiňuje v roce 1890 Burns. Projevuje se asymetrickou slabostí a trofiemi dolních končetin s patelární areflexií většinou bez poruch citlivosti u nemocných s kratším trváním diabetu.

## **III. Asymetrické mono a polyneuropatie**

Tato forma se může objevit na kterémkoli periferním nervu. Mononeuropatie mozkových nervů postihují nejčastěji okohybný nerv a lícni nerv. Působením diabetické polyneuropatie jsou nervy v uvedených úžinách křehčí než u zdravých lidí a dochází k rozvoji úžinových syndromů. Nejčastější je postižení středového nervu v karpálním tunelu a klinicky se projevuje syndromem karpálního tunelu.

## **IV. Kombinace asymetrické polyneuropatie se symetrickou distální polyneuropatií**

Tato skupina je velmi různorodá a jedná se o různé kombinace polyneuropatií a mononeuropatií uvedených v bodu I., II. a III.

## **V. Polyneuropatie autonomního nervového systému**

Autonomní polyneuropatie postihuje 20-40 % diabetiků a její běžné projevy můžeme rozdělit do několika skupin:

- Postižení srdce – tato autonomní polyneuropatie je nejzákladnější, protože ve velmi krátké době může způsobit necitlivost pro anginózní ischemickou



bolest a to způsobí, že nemocný nepocítuje záchvaty angíny pectoris a nepozná ani prodělaný infarkt myokardu.

- Postižení zažívacího traktu – dochází ke zpomalení pasáže potravy jícnem a klinicky se toto onemocnění projevuje jako porucha polykání. Závažnější je postižení žaludku, které zpomaluje vyprazdňování žaludečního obsahu a ve svém důsledku může způsobit i rozkolísání diabetu, protože po aplikaci inzulínu může zpomalené vyprazdňování způsobit hypoglykémii po jídle. Až 60 % dlouhodobě nekompenzovaných diabetiků má úpornou zácpu v důsledku autonomní polyneuropatie postihující tlusté střevo.
- Postižení urogenitálního systému – u mužů se mohou objevit obtíže při vyprazdňování močového měchýře a impotence.
- Ostatní potíže – u diabetiků je další obtíží postižení inervace zornic, které způsobuje zpomalenou fotoreakci a přináší komplikaci v noci při řízení auta. Další nepříjemnou komplikací je vymizení pocení na dolních končetinách, kde v důsledku vysušení kůže může dojít až k rozvoji diabetické nohy (Bartoušek 2001, 2002).

### 3.4.3.3 Vyšetření pacientů s diabetickou polyneuropatií

K lékaři se mnoho lidí dostavuje se subjektivními senzitivními potížemi na akrech dolních končetin. Netuší ale, že se může jednat o komplikaci ještě nediagnostikovaného diabetu, a proto, pokud se objeví pacient s klinicky již rozvinutou polyneuropatií, je důležité nejprve vyloučit diabetes mellitus (Bartoušek, 2001).

- ***Vyšetření diabetes mellitus***

Diabetes mellitus lze diagnostikovat na základě výsledku glukózového tolerančního testu (oGTT): nejprve se odebere žilní krev na lačno a čeká se na výsledek glykémie. Je-li vyšší než 6,9 mmol/l oGTT se neprovádí. Pokud je v rozmezí hodnot 5,6 – 6,9 mmol/l, tento funkční test provedeme. Pacientovi se podá 75 g glukózy v 250 ml roztoku a pacient to musí během 5-10 minut vypít. Hodnotícím kritériem je koncentrace glukózy v plazmě žilní krve 2 hodiny po podání glukózy. Diabetes můžeme vyloučit, pokud je koncentrace glukózy nižší než 7,8 mmol/l. Pokud je koncentrace v rozmezí 7,8 – 11,1 mmol/l, jedná se o porušenou glukózovou toleranci a diabetes mellitus diagnostikujeme, pokud je koncentrace glukózy vyšší než 11,1 mmol/l (internet 2).

- ***Vyšetření diabetických polyneuropatií***

Ke zjištění polyneuropatie se používá dotazníku. Toto vyšetření je velmi praktické. Používá se Michiganský dotazník (Feldman 1994) Modifikace dle Rušavého 1998 (tabulka 3.1). Hodnocení tohoto dotazníku se provádí tak, že se sečtou všechny body a vydělí se 12. Výsledek nižší než 1,5 diagnostikuje diabetickou polyneuropatii.

1. Máte pocit zhoršení citlivosti na rukou nebo nohou?	1 bod – ano	2 body – ne
2. Měl jste někdy pálivé bolesti nohou?	1 bod – ano	2 body – ne
3. Máte pocit těžkých nohou?	1 bod – ano	2 body – ne
4. Jsou Vaše nohy přecitlivělé na dotyk?	1 bod – ano	2 body – ne
5. Měl jste někdy píchání nebo bodání v nohou?	1 bod – ano	2 body – ne
6. Vnímáte bolestivě i dotyk příkrývky na pokožku?	1 bod – ano	2 body – ne
7. Jste schopen určit místo bolesti?	1 bod – ano	2 body – ne
8. Jste schopen při koupání rozlišit teplou a studenou vodu?	1 bod – ano	2 body – ne
9. Řekl Vám již lékař, že máte diabetickou polyneuropatii?	1 bod – ano	2 body – ne
10. Jsou Vaše příznaky horší v noci?	1 bod – ano	2 body – ne
11. Máte na nohou tak suchou kůži, že vznikají praskliny?	1 bod – ano	2 body – ne
12. Prodělal jste amputaci?	1 bod – ano	2 body – ne

**Tabulka 3.1 Michiganský dotazník, Modifikace dle Rušavého 1998**

- ***Elektromyografické vyšetření***

Elektrofyzilogické vyšetření je nejcennějším vyšetřením, které objektivizuje diabetickou polyneuropatii a je ji schopno zcela jednoznačně potvrdit a navíc určit i stupeň postižení. Hodnocení EMG nálezu je v tabulce 3.2 (Bartoušek,2001).

<b>1. subklinická neuropatie</b>		pouze prodloužení lat. F vlny
<b>2. lehká</b>	myelin axonální	zpomalení kmenového vedení o 10 % lehká simplifikace kontralaterálně křivky bez denervací
<b>3. střední</b>	myelin axonální	zpomalení kmenového vedení o 20 % lehká simplifikace kontralaterálně ojediněle denervace
<b>4. těžká</b>	myelin axonální	zpomalení kmenového vedení o 30 % snížení sumace svalového potenciálu simplifikace kontralaterální křivky vyšší amplituda AP časté denervace
<b>5. velmi těžká</b>	myelin axonální	zpomalení kmenového vedení víc než o 30 % snížení sumačního svalového potenciálu pod 2,5 mV výrazná simplifikacekontralaterální křivky časté denervace

**Tabulka 3.2 EMG klasifikace neuropatií**

#### 3.4.3.4 Léčba diabetické polyneuropatie

Nejdůležitější je výborná a nebo alespoň uspokojivá metabolická kompenzace, která je dnes vyjádřena hodnotami lačné glykemie, glykovaného hemoglobinu a postprandiální glykemie. Přítomnost polyneuropatie znamená riziko pro vznik diabetické nohy. Do symptomatické léčby patří analgetika, antidepresiva a antikonvulziva.

- **Kauzální terapie** – vhodná pro všechny typy diabetické polyneuropatie.

Je to léčba, která zasahuje na úrovni patogenetických mechanismů vzniku polyneuropatie. K testovaným kauzálním přístupům patří použití inhibitorů aldózo-reduktázy, gangliosidů, gama-linoleové kyseliny, myoinositolu, nervového růstového faktorů, inhibitoru proteinkinázy C a acetyl-L-karnitinu.

- **Symptomatická terapie** – vhodná pro bolestivé formy a těžší stupně diabetické polyneuropatie.

Do této skupiny patří analgetika (Acylpyrin, Paralen, Ataralgin, steroidní antirevmatika – Ibuprofen), antidepresiva (tricyklická antidepresiva – imipramin) a antikonvulziva (karbamazepin, klonazepam, gabapentin, pregabalin).

- **Další terapie** – vhodná pro lehčí a středně těžké stupně diabetické polyneuropatie.

Sem řadíme používání vitaminů skupiny B a kyseliny alfa-lipoové a také fyzioterapeutickou léčbu – rehabilitace. Základem rehabilitace je pohyb – procházky, jízda na kole, plavání, gymnastika nohou, masáže, vířivé koupele (Olšovský, 2006).

## 3.5 Chromatografie

### 3.5.1 Principy chromatografie

Chromatografie je analytická i preparativní dělicí metoda, při které se dosahuje rozdělení látek na základě jejich rozdílné migrace v systému dvou fází. Jedna fáze je zakotvená neboli stacionární a druhá je pohyblivá neboli mobilní. K rozdílům v migraci dochází na základě rozdílné adsorpce, rozdělování, výměny iontů, efektu molekulového síta, apod.

Stacionární fázi většinou tvoří tuhý sorbent nebo kapalina zachycená na nosiči. Touto stacionární fází protéká mobilní fáze, kterou představuje kapalina nebo plyn. Z toho vyplývá, že se setkáváme s dvojicemi fází: tuhá látka-plyn, tuhá látka-kapalina, kapalina-kapalina a kapalina-plyn. Podle skupenství mobilní fáze dělíme chromatografie na plynovou a kapalinovou.

Podle experimentálního uspořádání dělíme chromatografie ještě na chromatografii sloupcovou (sem řadíme chromatografii plynovou a kapalinovou sloupcovou) a chromatografii v plošném uspořádání (sem řadíme chromatografii na papíře a na tenké vrstvě).

Při sloupcové chromatografii látky putují sloupcem v podobě zón a při preparativním provedení se získávají izolované frakce mobilní fáze s rozdělenými látkami, zatímco při analytickém provedení je výsledkem záznam změny koncentrace s časem nebo

objemem proteklé mobilní fáze. Pro jednotlivé sloučeniny je charakteristická poloha píku daná elučním časem nebo objemem. Výška píku udává koncentraci.

Při chromatografii v plošném uspořádání putují látky na analytickém chromatogramu v podobě skvrn, které se detekují vhodnou fyzikální, chemickou nebo biologickou metodou. Na preparativním chromatogramu putují v podobě různě širokých pruhů, které můžeme mechanicky oddělit a rozdělenou látku eluovat pro účely kvantitativní analýzy nebo pro preparativní účely. Při kruhové chromatografii putují látky ve tvaru mezikruží nebo výseče mezikruží. Výhodou plošného uspořádání je, že kromě analyzovaného vzorku lze současně chromatografovat libovolný počet autentických sloučenin pro potvrzení identity jednotlivých složek analyzované směsi nebo porovnávání intenzity jejich skvrn. Každá sloučenina má svou charakteristickou polohu skvrny na chromatogramu i chování při detekci. Velikost či intenzita skvrny je přímo úměrná množství detekované látky. Další výhodou plošného uspořádání je možnost dvojrozměrné chromatografie (Gasparič, Churáček, 1981).

### **3.5.2 Základní typy chromatografie**

#### **3.5.2.1 Rozdělovací chromatografie**

Tato chromatografie je založena na rozdělování látky mezi dvě kapalně, vzájemně nemísitelné fáze. Při dělení jsou molekuly dělené látky po určitou dobu ve styku s oběma fázemi. Dojde k ustavení rovnováhy a po odstranění obou rozpouštědel dojde k rozdělení dané látky mezi ně při dané teplotě úměrné poměru výsledných sil, kterými je daná látka poutána ke každé z fází. Poměr těchto sil je vyjádřen rozdělovacím koeficientem  $\alpha$ , který je dán poměrem koncentrací stanovované látky v jedné i druhé fázi:

$$\alpha = \frac{C_L}{C_S}$$

Dělicí schopnost rozdělovací chromatografie je tedy dána rozdíly v rozdělovacích koeficientech jednotlivých komponent, které chceme od sebe oddělit, v dané soustavě fází (Lábler, Schwartz, 1965).

#### **3.5.2.2 Adsorpční chromatografie**

Tento typ chromatografie je charakterizován rozdělováním látky mezi kapalnou (pohyblivou) a pevnou (nepohyblivou) fází. Pevná fáze je adsorbent. K adsorbentu může být látka poutána pouze na povrchu, a to na místech, která nazýváme aktivní centra. Pokud

je látka silně polární, obsadí i velmi slabá aktivní centra. Čím je látka méně polární, tím menší počet aktivních center obsazuje. Obsazení center je také závislé na koncentraci adsorbované látky v rozpouštědle. S rostoucí koncentrací stoupá i počet obsazených aktivních center.

Nejvýznamnějším rozdílem adsorpční chromatografie od rozdělovací chromatografie je skutečnost, že se zvyšujícím se počtem skupin v molekule nerostou úměrně síly, kterými je látka poutána k adsorbentu.

Při chromatografii na tenké vrstvě a při použití rozpouštědlových soustav o více složkách může dojít k jednomu z typů adsorpční chromatografie – chromatografii vytěšňovací.

Chromatografie vytěšňovací se uplatňuje tehdy, jsou-li dělené látky poutány k adsorbentu slaběji než polární složka rozpouštědla, která je z adsorbentu vytěšňuje a tlačí před sebou. Chromatografovaná látka je v tomto případě přímo před vedlejším čelem a skvrna má obvykle charakteristický plochý tvar. Je-li v rozdělované směsi více látek, které jsou děleny na základě vytěšňovacího principu, seřadí se podle stoupající adsorptivity a vytvoří úzké pásy, které na sebe těsně navazují (Lábler, Schwartz, 1965).

### **3.5.2.3 Chromatografie na měničích iontů**

Při tomto typu chromatografie dochází opakovaně k výměně chromatografované látky iontového charakteru mezi substrát s iontovýmennou schopností a mezi eluční systém obsahující ionty. Přitom je podmínkou, aby chromatografovaná látka byla poutána silněji než ionty přidané do elučního systému (Lábler, Schwartz, 1965).

### **3.5.3 Chromatografie na tenké vrstvě**

K chromatografickému procesu zde dochází při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou jednozrnného sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze, který je rozprostřen a buď volně nasypán, nebo fixován na vhodné podložce. Podložkou může být skleněná deska, hliníková folie nebo plastová folie.

Vzorek se nanese na start jako u papírové chromatografie a po odpaření rozpouštědla se deska uloží do chromatografické vany s mobilní fází na dně a vyvíjí se vzestupně nebo horizontálně. Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne potřebné vzdálenosti, chromatogram vyjmeme a provedeme detekci.

Dělení látek probíhá na základě různých mechanismů podle toho, jaký materiál zvolíme pro tenkou vrstvu. Volbě materiálu pro tenkou vrstvu a zvolenému dělicímu mechanismu musí odpovídat i volba mobilní fáze.

Adsorbenty jsou tuhé látky schopné reverzibilně vázat na svém povrchu jiné chemické látky v kapalně nebo plynné fázi, a to působením sil fyzikálních (van der Waalsovy síly) nebo chemických (tvorba vodíkových můstků, chemisorpce).

Nosičem kapalně fáze může být jakýkoli materiál, který svou velikostí částic umožňuje pravidelný a přiměřeně rychlý průtok mobilní fáze a je schopen pojmout zakotvenou fázi – vodu nebo málo těkavé organické rozpouštědlo. Nejčastěji se používá silikagel nebo prášková celulóza. Druhým nejčastějším anorganickým adsorbentem na tenké vrstvy je oxid hlinitý. Často se používá pro preparativní chromatografii ve volně ložených vrstvách.

Během let došlo k miniaturizaci zařízení pro tenkovrstvou chromatografii a začala se používat vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC). Výhodou je podstatné zmenšení množství nanášených látek. Zlepšení dělicích vlastností se dosahuje použitím dobře vytříbeného mikropórovitého silikagelu a vytvořením velmi tenké a rovnoměrné vrstvy (Gasparič, Churáček, 1981).

Vzorky se na hliníkovou folii s litým silikagelem nebo oxidem hlinitým nanášejí pipetou a vyvíjejí se v chromatografické vaně nasycené mobilní fází. Můžeme použít i dvourozměrné tenkovrstvé techniky, kdy se chromatogram po doběhnutí čela rozpouštědla na konec desky vysuší, deska se otočí o 90° a provede se chromatografie v kolmém směru s jinou soustavou rozpouštědel. Detekce může být destruktivní - reakce s  $H_2SO_4$ ,  $KMnO_4$ ,  $K_2Cr_2O_7$ , nebo nedestruktivní - UV světlo, přechodná absorpce par jódu (Štern a spol. 2005).

### **3.5.4 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie je fyzikálně-chemická metody, při které dochází k dělení směsi látek na základě rozdělení mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází je plyn a stacionární fází může být pevná látka (adsorpční plynová chromatografie) nebo kapalina (rozdělovací plynová chromatografie).

Pevné vzorky se předem rozpustí v těkavých kapalinách. Vzorky se nastříkují do vyhřívaného dávkovače přes plynotěsnou elastickou membránu. Poté dojde ke zplynění

vzorku a jeho páry jsou nosným plynem, kterým je většinou argon nebo dusík, unášeny do vyhřívané kolony.

Používají se náplňové nebo kapilární kolony. Při průchodu kolonou dojde k rozdělení jednotlivých látek na principu adsorpční nebo rozdělovací chromatografie. Po rozdělení procházejí separované sloučeniny detektorem.

Detektor pracuje na plameno-ionizačním principu, kde se rozdělené složky zavádějí do plamene vodík-vzduch a sleduje se jejich ionizace. Můžeme také použít detektor elektronového záchytu, kde dochází k zachycení elektronů z  $\gamma$ -zářiče elektronegativními atomy stanovované látky a tím ke snížení měřeného ionizačního proudu. Pro stanovení jednotlivých složek separovaných plynovou chromatografií lze použít také hmotnostní spektrometr (Štern a spol. 2005).



## 4 Experimentální část

### 4.1 Popis vzorků

Analyzované vzorky EDTA plazmy jsou anonymní. Zpracovalo se 30 vzorků krevní plazmy pacientů z neurologického oddělení Krajské nemocnice Pardubice a to 10 vzorků pacientů s diabetickou neuropatií, 10 vzorků pacientů s diabetem a 10 vzorků pacientů bez výše uvedených diabetických nálezů. Tyto vzorky byly odeslány na chromatografickou analýzu do Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Eberhard-Karl-Universität v Tübingenu v rámci Grantu evropské unie s názvem CARE-MAN. Vzorky byly rozděleny tenkovrstevnou chromatografií a následně analyzovány plynovou chromatografií.

Stanovení analytických koncentrací a procentuálního obsahu 20 fyziologických mastných kyselin ve 4 lipidových frakcích EDTA plazmy u 15 vybraných pacientů s ohledem na srovnatelnost pohlaví, věku a glykémie bylo provedeno pomocí plynové chromatografie.

### 4.2 Přístrojové vybavení a používaný materiál

#### 4.2.1 Přístrojové vybavení

- Centrifuge type MPW-340  
Výrobce: Mechanika Precyzna, Polsko.  
Distributor: Servis Unimed, Vestec 41, 25242 Vestec u Prahy, ČR.
- Spektrofotometr, Spekol 11, CARL Zeiss, Jena, DDR.
- Třepačka Vortex typ: REAX top.  
Výrobce: Heidolph instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach, Německo.
- Odpařovací termostat TERMOVAP TV 10.  
Výrobce: ECOM s.r.o, Americká 3, 120 35 Praha 2, ČR.

- Sušárna HS 62 A.  
Výrobce: Chirana, CHIRANA GROUP, a.s. Velká 2984/23, 70200 Ostrava – Moravská Ostrava, ČR.
- Pipety – 100µl, pipety pro organiku 250 µl, 500 µl, skleněné pipety 1ml, 5ml, 10ml.
- Plynový chromatograf firmy Hewlett – Packard 5890A s autosamplerem
- Kapilární kolona firmy Restek RTx – 2330 (10 % cyanopropylphenyl, 90 % biscyanopropylpolysiloxane, délka kolony 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,2 µm, Restek, Bellefonte, PA, USA)
- Pyrexové zkumavky.  
Výrobce: Firma Barloworld Scientific Ltd., Stone, Staffs, ST15 0SA, Anglie,  
Značka 1636/26MP, 761152 Culture Tube 16x100 SVL SCRE s teflonovým těsněním.

#### 4.2.2 Používaný materiál

##### **Extrakční směs: chloroform - methanol.**

- Chloroform p. a., balení 1000 ml, destilační rozmezí 59,5 - 62 °C, hustota 1,470 kg/l.

Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.

- Methanol p.a., balení 1000 ml, obsah 99 %, hustota 0,790 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.

##### **Dusík.**

- Dusík 4,6 (99,9 %).

Výrobce a dodavatel: Linde Technoplyn, U technoplynu 1324, 198 00 Praha 1, ČR.

##### **Standard.**

- Standard Reprochol - lidské nebo koňské sérum se zvýšenou hodnotou cholesterolu.

Číslo šarže: 201181195, balení 8 x 5 ml.

Výrobce: IMUNA, š.p., Šarišské Michalany.

### **Chromatografická soustava: hexan - diethylether - kyselina octová**

- Hexan p.a., balení 900 ml, obsah 99 %, hustota 0,660 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.
- Diethylether, balení 1000 ml, bod varu 34 - 35 °C, hustota 0,710 kg/l.  
Výrobce: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Německo.  
Distributor: MERCK s.r.o., Zděbradská 72, 251 01 Říčany - Jažlovice, ČR.
- Kyselina octová p.a., balení 900 ml, obsah 99 %, hustota 1,050 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.

### **Chromatografické desky.**

- TLC plate 20 x 20 cm, No. 1.05721, Silica gel 60.  
Výrobce: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Německo.  
Distributor: MERCK, s.r.o, Zděbradská 72, 251 01 Říčany - Jažlovice, ČR.

### **Detekční činidlo: kyselina fosfomolybdenová (20 % roztok) v ethanolu.**

- Kyselina fosfomolybdenová.  
Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Riedstrasse 2, 89555 Steinheim, Německo.  
Distributor: SIGMA-ALDRICH s.r.o., Pobřežní 46, 186 21 Praha 8, ČR.
- Ethanol pro UV spektroskopii, balení 1000 ml, hustota 0,810 kg/l.  
Výrobce: LACHEMA Brno, Karásek 1, 62133 Brno, ČR.

### **Stanovení jednotlivých frakcí lipidů s kyselinou sírovou a standardem.**

- Kyselina sírová p.a., hustota 1,830 g/l.  
Výrobce: PENTA, ing. Petr Švec, Výroba a prodej čistých, farmaceutických a speciálních chemikálií, Výrobní devize Chrudim, IČ. 10140751, ČR.
- Směsný standard Dade: (kyselina stearová 10 %, kyselina palmitová 10 %, kyselina olejová 80 %) celková koncentrace 8 g/l.

Souprava LACHEMA - BIO-TEST "Celkové lipidy" (TL 180) Kat. č. 1135801,

Výrobce Lachema Diagnostica, Karásek 1, 621 33 BRNO, ČR.

### **Fosfovanilinové činidlo: kyselina o-fosforečná - vanilinum.**

- Kyselina o-fosforečná 85 % p.a., balení 1000 ml, obsah 84 - 86 %, hustota 1,710 kg/l.  
Výrobce: LACHEMA Brno, Karásek 1, 62133 BRNO, ČR.
- Vanilinum, balení 10 g.  
Výrobce: Zdravotnické zásobování, sklad Říčany u Prahy, atest: SUKL 3241/84.

## **4.3 Metodika tenkovrstevné chromatografie**

### **4.3.1 Extrakce lipidů ze vzorku**

Do centrifugačních zkumavek byly napipetovány 4ml směsi chloroform-metanol (1:1) a přidáno 0,2ml séra. Směs byla protřepána, uzavřena a centrifugována na stolní centrifuze při 3000 rpm po dobu 5 minut. Horní vrstva (3,5ml) byla opatrně odsána pomocí pipety do jiné zkumavky. Bylo zapnuto odsávání v digestoři a při 60°C bylo během 20 minut provedeno odpaření pod dusíkem do sucha. Tímto způsobem jsme získaly odpařené extrakty.

### 4.3.2 Chromatografie a identifikace kyselinou fosfomolybdenovou

- **Příprava mobilní fáze:**

Byla vytvořena směs 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml kyseliny octové (cca 98%). Tato směs byla v odměrném válci řádně promíchána a opatrně nalita do chromatografické vany. Vana byla uzavřena a ponechána 40-50 minut nasytit.

- **Příprava chromatografické desky :**

Na chromatografické desce (TLC desky Silikagel 60, bez fluorescenčního indikátoru) byl vyznačen obyčejnou tužkou rámeček: dolní okraj 2,5 cm, horní okraj a strany 1 cm. Plocha uvnitř rámečku byla rozdělena na 5 polí po 3,6 cm a nahoře byly jednotlivé dráhy označeny. Při označování bylo dbáno na to, aby se hlavně startovní čára nepoškrábala.

- **Postup chromatografie:**

Odpařený extrakt byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l směsi chloroform-metanol (2:1). Tento celý objem byl nanesen postupně v několika dávkách pasturovou pipetou na chromatografickou desku a po každém nanesení se nechalo rozpouštědlo zcela odpařit. Poté byla chromatografická deska vložena do nasycené chromatografické vany, rychle uzavřena a asi 60 minut nechána vyvíjet do doby, než čelo mobilní fáze dosáhlo 1 cm od horního okraje desky. Poté byla deska vyjmuta z vany a nechána v digestoři vysušit.

- **Příprava kyseliny fosfomolybdenové 0,05 mol/l – detekční činidlo:**

Z 20% zásobního roztoku firmy Aldrich bylo odměřeno 10 ml a přidáno 10 ml etanolu p.a.. Detekční činidlo bylo promícháno a nalito do rozprašovače a rovnoměrně jím bylo postříkáno pole se standardem na chromatografické desce ze vzdálenosti 20 – 30 cm. Deska byla poté vložena na 5 – 10 minut do sušárny vyhřáté na cca 60 °C.

### 4.3.3 Izolace jednotlivých složek lipidů

Lipidy byly chromatograficky rozděleny na 5 složek seřazených podle vzrůstajícího retenčního faktoru (RF): fosfolipidy (PL), diacylglyceroly (DG), volné mastné kyseliny (VMK), triacylglyceroly (TG) a estery cholesterolu (ECH). Podle standardu byly označené jednotlivé složky obyčejnou tužkou tak, aby horní okraj místa obsahující označovanou složku byl 0,5 cm nad skvrnou standardu a dolní okraj rovněž 0,5 cm pod skvrnou standardu. Označené složky byly vyškrábány z chromatografické desky a pomocí špachtle přeneseny do předem označených zkumavek s uzávěrem. Frakce DG nebyla izolována, protože se v ní koncentroval i neesterifikovaný krevní cholesterol a výsledky chromatografické analýzy nebyly reprodukovatelné.

### 4.3.4 Stanovení celkových lipidů

Celkové lipidy se vyextrahují ze silikagelového nosiče 4 ml směsi chloroform-metanol (1:1), uzavřené zkumavky se 2 minuty intenzivně promíchávají a centrifugují se 5 minut při 3000 rpm. Supernatant se odpipetuje do nových zkumavek a při pokojové teplotě se během 20 minut odpaří do sucha pod dusíkem. Do všech zkumavek s odparkem se přidá po 1,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Jako standard se použije 0,02 ml roztoku kyseliny stearové (20%) a olejové (80%) o koncentraci 8 g/l. Zkumavky (blank i standardy) se promíchají a 15 minut zahřívají v olejové lázni při 110 °C. Po ochlazení se ze zkumavek odpipetuje 0,1 ml hydrolyzátu.

- **Příprava fosfovanilinového činidla:**

V 47 ml destilované vody se rozpustí 0,304 g vanilinu a za stálého míchání se přidává 157 ml kyseliny o-fosforečné (85%).

K 0,1 ml hydrolyzátu se přidá 1,5ml fosfovanilinového činidla. Směs se nechá 5 minut reagovat při laboratorní teplotě a do 10 minut se změří absorbance vzorků a standardu při vlnové délce 530 nm.

- **Vzorec pro výpočet koncentrace celkových lipidů:**

$$\text{celkové lipidy (g/l)} = 8 \cdot \left( \frac{A_{VZ}}{A_{ST}} \right) \cdot F,$$

Kde  $A_{VZ}$  je absorbance vzorků proti blanku,  $A_{ST}$  je absorbance standardu proti blanku a  $F$  je zředovací faktor pro krevní sérum.

$F = 0,4167$  (bylo odpipetováno 0,2 ml séra, rozpuštěno ve 4 ml a odpipetováno pouze 3,5 ml a dále rozpuštěno ve 4 ml a z toho odebráno pouze 2 ml).

## 4.4 Derivatizace – převedení na methylestery

Do pyrexové zkumavky s vloženým teflonovým mikromíchadlem se železným jádrem a silikagelovou vrstvou obsahující příslušnou lipidovou frakci se přidá 1 ml roztoku inertního standardu o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  (cis-13, 16, 19-docosatrienová kyselina) a 1 ml směsi toluen-metanol (4:1). Zkumavka se vloží do termobloku s magnetickým míchadlem a za studena se pomalu přidá 200  $\mu\text{l}$  acetylchloridu jako katalyzátoru esterifikace. Zkumavka se uzavře šroubovacím teflonovým uzávěrem a zahřívá se za stálého míchání 1 hodinu na 100  $^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí reakční doby se zkumavka ochladí stáním v digestoři a neutralizuje se 5 ml 6 %  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , dále se reakční směs 2 minuty intenzivně míchá a poté se 10 minut centrifuguje při 3000 rpm. Horní fáze se odpipetuje a odpaří pod dusíkem při laboratorní teplotě až na objem 80  $\mu\text{l}$ . Tento roztok se převede do 1 ml chromatografických vialek s 0,1 ml separačním nástavcem a analyzuje se plynovou chromatografií.

## 4.5 Plynová chromatografie

Analýza byla provedena pomocí plynového chromatografu firmy Hewlett – Packard 5890A s autosamplerem. K analýze byla použita kapilární kolona firmy Restek RTx – 2330 (10 % cyanopropylphenyl, 90 % biscyanopropylpolysiloxane, délka kolony 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,2  $\mu\text{m}$ , Restek, Bellefonte, PA, USA). Teplota nástřiku byla 230  $^{\circ}\text{C}$  a teplota detektoru byla 250  $^{\circ}\text{C}$ . Teplotní program analýzy: počáteční

teplota 130 °C (2 minuty), poté teplotní gradient 2 °C/minutu a finální teplota 258 °C (6 minut). Analýza jednoho vzorku včetně promytí trvala 80 minut.

K přiřazení jednotlivých píků mastných kyselin byly použity eluční časy získané pomocí měření standardního roztoku fyziologických mastných kyselin v poolové EDTA plazmě. Všechny analýzy byly prováděny s použitím vnitřního standardu.



## 5 Výsledky

U 15 obdržených vzorků jsem nejprve stanovila koncentraci glukózy a poté je podle této koncentrace rozdělila na 3 skupiny pacientů – do první skupiny jsem zařadila pacienty s diabetickou neuropatií, do druhé skupiny pacienty s diabetes mellitus a do třetí skupiny zdravé osoby.

Poté jsem každý vzorek pomocí tenkovrstvé chromatografie rozseparovala na jednotlivé třídy lipidů – fosfolipidy, diacylglyceroly, triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a estery cholesterolu. Diacylglyceroly jsou pro další analýzy nevýznamné, proto jsem s nimi dále nepracovala.

U fosfolipidů, triacylglycerolů, volných mastných kyselin a esterů cholesterolu jsem dále pomocí plynové chromatografie stanovila procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin.

V následujících tabulkách jsou uvedeny získané hodnoty z jednotlivých měření.

### 5.1 Koncentrace glukózy, triacylglycerolů a cholesterolu v jednotlivých vzorcích

Tabulka 5.1 Koncentrace glukózy, triacylglycerolu a cholesterolu u pacientů s diabetickou neuropatií

	Číslo vzorku	1	2	3	4	5
	Pacient	5	2	1	3	4
Glukóza (mmol/l)		6,5	8,0	8,1	11,4	12,5
Triacylglyceroly (mmol/l)		1,7	2,6	1,3	1,6	3,4
Cholesterol (mmol/l)		3,4	4,4	3,0	3,0	6,4

Tabulka 5.2 Koncentrace glukózy, triacylglycerolu a cholesterolu u pacientů s diabetes mellitus

	Číslo vzorku	6	7	8	9	10
	Pacient	12	15	7	6	10
Glukóza (mmol/l)		5,7	6,2	9,8	14,1	17,8
Triacylglyceroly (mmol/l)		1,9	1,4	1,7	1,9	1,7
Cholesterol (mmol/l)		4,6	3,1	5,5	5,6	4,5

Tabulka 5.3 Koncentrace glukózy, triacylglycerolu a cholesterolu u zdravých osob

	Číslo vzorku	11	12	13	14	15
	Pacient	14	8	13	11	9
Glukóza (mmol/l)		6,2	7,0	7,8	8,2	9,1
Triacylglyceroly (mmol/l)		5,8	1,7	0,7	3,1	0,8
Cholesterol (mmol/l)		4,8	6,9	5,4	3,9	3,3

## 5.2 Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin

Tabulka 5.4 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u pacientů s diabetickou neuropatií

	Číslo vzorku	1	2	3	4	5
	pacient	5	2	1	3	4
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,22	0,25	0,19	0,18	0,21
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,24	0,18	0,20	0,21	0,23
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	30,65	32,21	33,76	36,04	37,58
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	0,74	0,53	0,46	1,00	0,65
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	15,24	17,67	16,18	15,33	16,42
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	16,44	11,63	13,99	14,12	12,73
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,48	0,31	0,41	0,60	0,32
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	18,49	17,58	15,19	13,79	14,86
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,26	0,14	0,21	0,11	0,14
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,14	0,14	0,11	0,12	0,12
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	0,83	0,60	0,58	0,61	0,67
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,10	0,20	0,14	0,21	0,14
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	1,04	1,39	1,41	1,11	1,80
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	1,86	1,98	1,42	1,54	2,14
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	6,45	6,36	8,53	8,33	6,14
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	1,34	3,52	2,05	1,56	1,47
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	1,81	1,93	1,41	1,38	0,35
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,32	0,16	0,25	0,27	0,32
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	1,02	0,96	0,99	0,80	1,25
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	2,33	2,25	2,52	2,68	2,46

**Tabulka 5.5** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u pacientů s diabetes mellitus

	Číslo vzorku	6	7	8	9	10
	pacient	12	15	7	6	10
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,37	0,19	0,15	0,15	0,19
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,16	0,24	0,14	0,18	0,20
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	32,52	33,32	33,09	32,82	32,19
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	0,95	0,38	0,34	0,43	0,45
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	16,12	15,23	17,32	15,68	17,06
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	12,52	12,55	11,40	11,38	15,03
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,34	0,35	0,25	0,34	0,35
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	16,01	19,05	21,40	21,86	19,60
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,16	0,17	0,09	0,08	0,15
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,12	0,12	0,13	0,15	0,15
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	1,14	0,71	0,51	0,91	0,66
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,21	0,21	0,21	0,25	0,27
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	1,10	1,04	1,06	1,11	1,30
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	2,10	1,83	2,34	2,21	2,58
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	6,23	6,78	5,18	5,53	3,47
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	4,13	1,22	1,17	1,02	0,72
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	2,52	2,03	2,14	2,16	2,08
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,29	0,27	0,23	0,25	0,16
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	1,00	1,04	0,72	0,87	0,54
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	2,02	3,26	2,14	2,61	2,85

Tabulka 5.6 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u zdravých osob

	Číslo vzorku	11	12	13	14	15
	pacient	14	8	13	11	9
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,25	0,17	0,18	0,26	0,17
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,19	0,15	0,20	0,19	0,24
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	30,54	30,55	34,14	30,34	30,68
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	1,16	0,52	0,59	0,86	0,36
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	18,61	18,62	15,83	19,02	17,62
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	17,58	10,04	12,28	13,83	11,56
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,24	0,26	0,31	0,41	0,36
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	14,24	21,87	15,34	17,12	20,63
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,71	0,20	0,12	0,27	0,09
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,12	0,18	0,21	1,14	0,17
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	0,82	0,62	0,49	1,20	0,74
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,21	0,25	0,35	0,23	0,28
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	1,18	1,35	1,23	1,32	1,02
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	1,50	3,21	3,05	1,81	2,49
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	5,81	5,16	7,37	5,94	6,85
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	2,44	0,89	2,56	1,38	0,98
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	1,49	3,00	2,63	1,78	2,45
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,31	0,24	0,34	0,29	0,37
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,87	0,76	1,18	0,71	0,63
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	1,71	1,96	1,61	2,90	2,32

**Tabulka 5.7** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u pacientů s diabetickou polyneuropatií

	Číslo vzorku	1	2	3	4	5
	pacient	5	2	1	3	4
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	1,45	1,54	1,17	1,23	1,86
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,46	0,22	0,29	0,40	0,36
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	27,33	27,97	25,89	29,38	31,89
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	2,95	2,65	2,29	2,12	2,31
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	4,11	5,95	4,16	5,43	6,67
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	44,34	41,77	45,71	43,81	40,94
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,44	0,48	0,44	0,54	0,55
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	12,58	12,34	12,87	11,95	11,53
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,14	0,37	0,70	0,10	0,27
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,15	0,03	0,02	1,03	0,17
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	4,33	3,73	3,87	2,15	1,67
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,05	0,21	0,13	0,05	0,24
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,03	0,18	0,25	0,08	0,07
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,03	0,05	0,06	0,05	0,06
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	0,91	0,63	0,73	0,60	0,41
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,19	0,74	0,44	0,22	0,06
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,05	0,11	0,12	0,08	0,08
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,04	0,09	0,12	0,09	0,09
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,15	0,41	0,31	0,27	0,19
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,27	0,55	0,43	0,41	0,59

**Tabulka 5.8** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u pacientů s diabetes mellitus

	Číslo vzorku	6	7	8	9	10
	pacient	12	15	7	6	10
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,61	0,83	0,66	1,19	1,15
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,24	0,31	0,20	0,24	0,19
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	26,86	26,75	27,45	25,46	29,29
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	1,92	1,92	1,54	2,39	4,82
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	3,49	3,79	4,20	3,80	4,86
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	45,12	40,45	46,51	40,93	33,68
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,43	0,43	0,43	0,46	0,44
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	15,06	18,08	14,27	16,64	16,36
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,36	0,73	0,18	0,33	0,54
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	3,91	4,16	2,56	6,56	3,99
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,21	0,13	0,11	0,12	0,15
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,23	0,23	0,18	0,18	0,39
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,18	0,09	0,13	0,08	0,10
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	0,45	0,81	0,56	0,59	1,22
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,23	0,30	0,17	0,22	1,66
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,11	0,14	0,11	0,04	0,18
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,07	0,11	0,06	0,07	0,19
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,19	0,30	0,17	0,27	0,38
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,31	0,39	0,47	0,38	0,39

**Tabulka 5.9** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u zdravých osob

	Číslo vzorku	11	12	13	14	15
	pacient	14	8	13	11	9
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	3,40	1,81	1,23	2,30	1,93
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,45	0,29	0,29	0,38	0,38
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	34,41	27,98	27,41	32,31	26,96
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	4,09	3,16	3,44	3,51	2,39
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	5,88	4,47	4,06	5,91	4,62
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	39,37	38,07	45,89	41,90	40,54
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,34	0,42	0,45	0,42	0,44
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	6,15	17,06	10,79	7,62	14,76
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,91	0,69	0,47	0,42	0,19
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,05	0,03	0,03	0,09	0,04
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	2,89	3,96	2,67	3,48	5,76
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,22	0,13	0,15	0,15	0,15
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,11	0,21	0,33	0,14	0,24
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,09	0,06	0,17	0,13	0,06
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	0,58	0,65	0,88	0,43	0,55
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,47	0,25	0,64	0,20	0,26
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,14	0,09	0,17	0,08	0,09
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,08	0,08	0,10	0,06	0,08
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,14	0,19	0,31	0,12	0,22
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,22	0,41	0,52	0,35	0,33

**Tabulka 5.10** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u pacientů s diabetickou neuropatií

	Číslo vzorku	1	2	3	4	5
	pacient	5	2	1	3	4
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	2,10	1,89	2,07	1,96	1,43
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,97	0,50	0,60	0,57	0,44
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	26,92	27,36	27,03	30,90	27,91
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	2,11	2,11	1,95	1,76	2,35
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	13,97	13,30	14,08	24,46	13,57
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	26,66	34,18	31,10	19,29	36,57
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,32	0,43	0,36	0,28	0,47
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	15,04	9,89	10,55	9,73	9,68
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,87	0,20	0,28	0,29	0,22
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,09	0,05	0,11	0,12	0,01
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	4,03	3,99	3,27	3,07	3,50
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,28	0,08	0,25	0,31	0,10
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	1,97	1,01	1,60	1,44	0,86
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,61	0,32	0,93	0,83	0,37
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	1,10	0,72	1,34	1,36	0,64
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,73	1,77	0,99	1,09	0,44
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	1,17	0,56	1,20	1,03	0,50
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,37	0,22	0,67	0,41	0,25
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,22	0,26	0,34	0,19	0,22
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,47	1,14	1,28	0,91	0,46



**Tabulka 5.11** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u pacientů s diabetes mellitus

	Číslo vzorku	6	7	8	9	10
	pacient	12	15	7	6	10
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	1,43	2,00	1,02	0,17	1,08
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,20	0,61	0,22	0,22	0,37
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	26,77	26,42	25,77	26,83	21,75
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	5,23	2,26	1,50	2,00	1,62
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	9,67	12,79	11,26	14,24	10,69
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	37,01	34,33	40,48	32,48	42,61
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,55	0,38	0,38	0,39	0,41
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	10,36	11,16	12,30	12,41	12,85
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,30	0,54	0,18	0,17	0,33
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,04	0,11	0,05	0,10	0,08
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	3,84	3,15	3,47	5,15	3,74
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,86	0,40	0,15	0,13	0,52
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,52	1,56	0,74	1,55	1,00
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,22	0,51	0,36	0,65	0,53
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	0,60	0,70	0,44	0,80	0,59
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,54	0,53	0,24	0,43	0,44
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,33	0,93	0,60	0,99	0,68
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,16	0,28	0,24	0,48	0,29
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,23	0,51	0,14	0,19	0,15
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	1,13	0,85	0,45	0,62	0,29

Tabulka 5.12 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u zdravých osob

	Číslo vzorku	11	12	13	14	15
	pacient	14	8	13	11	9
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	3,38	2,39	2,20	1,88	1,94
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,46	0,25	0,41	0,21	0,43
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	31,99	26,75	26,52	28,95	27,33
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	3,39	1,62	1,48	1,73	1,47
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	10,66	13,67	13,96	18,22	16,71
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	34,98	27,36	36,63	30,63	28,93
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,33	0,33	0,27	0,35	0,36
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	7,32	15,27	8,80	7,75	10,74
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,53	0,62	0,47	0,40	0,42
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,07	0,07	0,09	0,13	0,11
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	3,78	3,65	3,71	3,42	4,61
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,20	0,11	0,38	0,59	0,34
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,69	2,65	1,20	1,50	1,60
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,24	0,65	0,58	0,71	0,88
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	0,46	1,47	0,70	0,87	0,98
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,42	0,98	0,64	0,42	0,76
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,41	0,98	0,95	1,04	1,24
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,10	0,34	0,33	0,45	0,57
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,19	0,14	0,20	0,15	0,12
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,39	0,71	0,50	0,62	0,47

**Tabulka 5.13** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u pacientů s diabetickou polyneuropatií

	Číslo vzorku	1	2	3	4	5
	pacient	5	2	1	3	4
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,52	0,54	0,46	0,44	0,49
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,22	0,19	0,21	0,19	0,18
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	16,97	14,81	15,89	17,19	15,10
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	3,40	2,59	2,19	4,75	3,74
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	1,77	1,80	1,42	1,95	1,33
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	26,62	26,15	27,10	31,28	24,84
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,37	0,31	0,37	0,54	0,26
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	39,58	40,59	39,10	31,11	43,22
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	1,43	1,18	1,64	1,26	1,47
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	2,16	1,95	1,58	1,69	2,44
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,20	0,03	0,05	0,02	0,12
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,35	0,42	0,45	0,41	0,44
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,07	0,05	0,03	0,09	0,04
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	4,24	4,56	6,06	5,82	3,89
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	1,24	3,34	2,16	1,67	1,51
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,10	0,08	0,15	0,08	0,06
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,05	0,06	0,03	0,06	0,04
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,21	0,37	0,32	0,18	0,24
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,48	1,01	0,79	1,23	0,57

**Tabulka 5.14** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u pacientů s diabetes mellitus

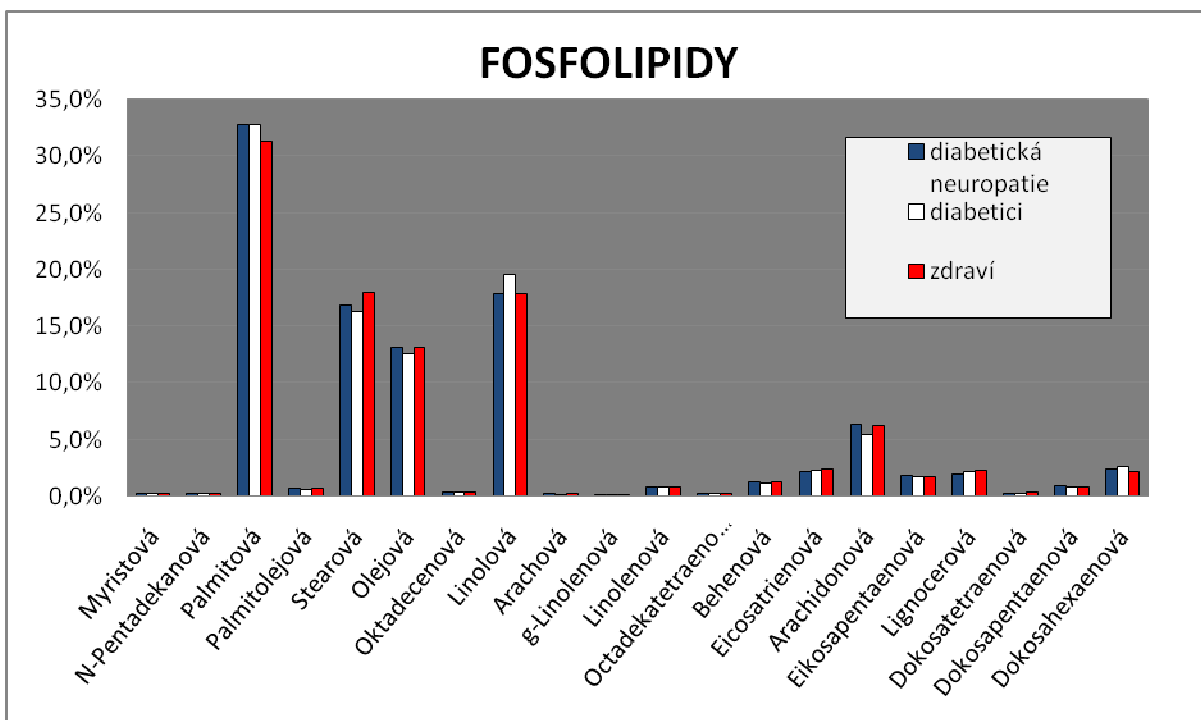
	Číslo vzorku	6	7	8	9	10
	pacient	12	15	7	6	10
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,59	0,39	0,39	0,49	0,32
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,16	0,24	0,18	0,18	0,16
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	13,49	14,41	13,65	13,79	12,74
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	5,92	1,89	2,38	2,89	1,79
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	0,88	1,24	1,38	1,22	1,00
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	24,90	23,62	23,12	23,79	26,09
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,28	0,31	0,23	0,28	0,26
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	42,22	47,69	50,19	47,81	48,85
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	1,81	1,29	0,99	0,95	1,25
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	1,72	1,76	1,79	2,22	2,03
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,10	0,05	0,14	0,06	0,04
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,38	0,39	0,36	0,45	0,51
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,06	0,04	0,04	0,05	0,04
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	4,15	4,70	3,29	3,89	3,15
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	2,29	1,15	1,02	1,10	0,97
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,06	0,03	0,06	0,09	0,07
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,05	0,02	0,03	0,04	0,03
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,19	0,14	0,18	0,14	0,12
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,75	0,62	0,56	0,53	0,58

Tabulka 5.15 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u zdravých osob

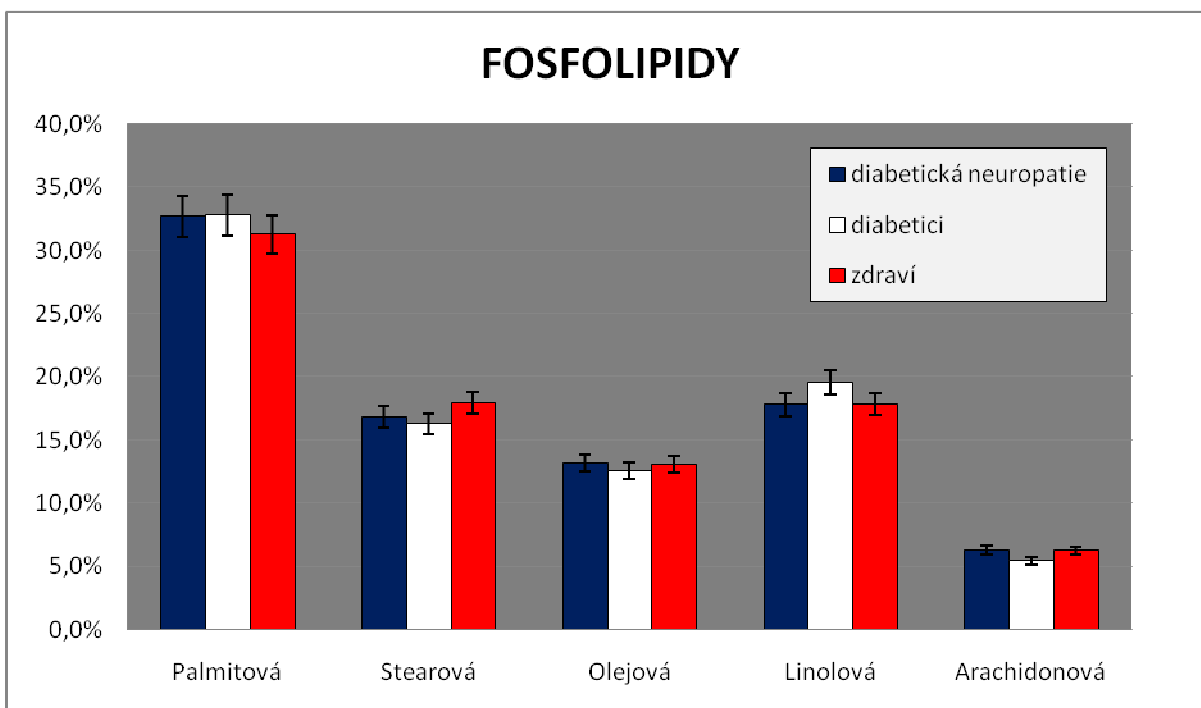
	Číslo vzorku	11	12	13	14	15
	pacient	14	8	13	11	9
		%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,58	0,29	0,50	0,57	0,36
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,23	0,11	0,19	0,23	0,21
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	13,89	11,89	14,40	14,67	12,95
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	5,24	2,31	4,33	4,43	1,85
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	1,09	1,16	0,98	1,42	1,37
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	28,09	18,65	27,22	24,43	19,63
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,23	0,20	0,28	0,35	0,31
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	37,56	56,52	39,24	41,36	53,20
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	4,36	1,42	1,60	1,55	0,73
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	1,81	1,80	1,29	2,50	1,91
<b>Octadekatetraenová</b>	<b>C 18:4 N3</b>	0,05	0,02	0,05	0,10	0,06
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,29	0,43	0,47	0,50	0,46
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,03	0,05	0,04	0,07	0,06
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	4,04	3,47	4,88	4,77	4,58
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	1,76	0,92	3,35	1,76	1,31
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,04	0,02	0,04	0,06	0,04
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,03	0,03	0,03	0,05	0,05
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,14	0,11	0,17	0,16	0,12
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,51	0,58	0,93	1,01	0,78

### 5.3 Grafy pro jednotlivé třídy lipidů

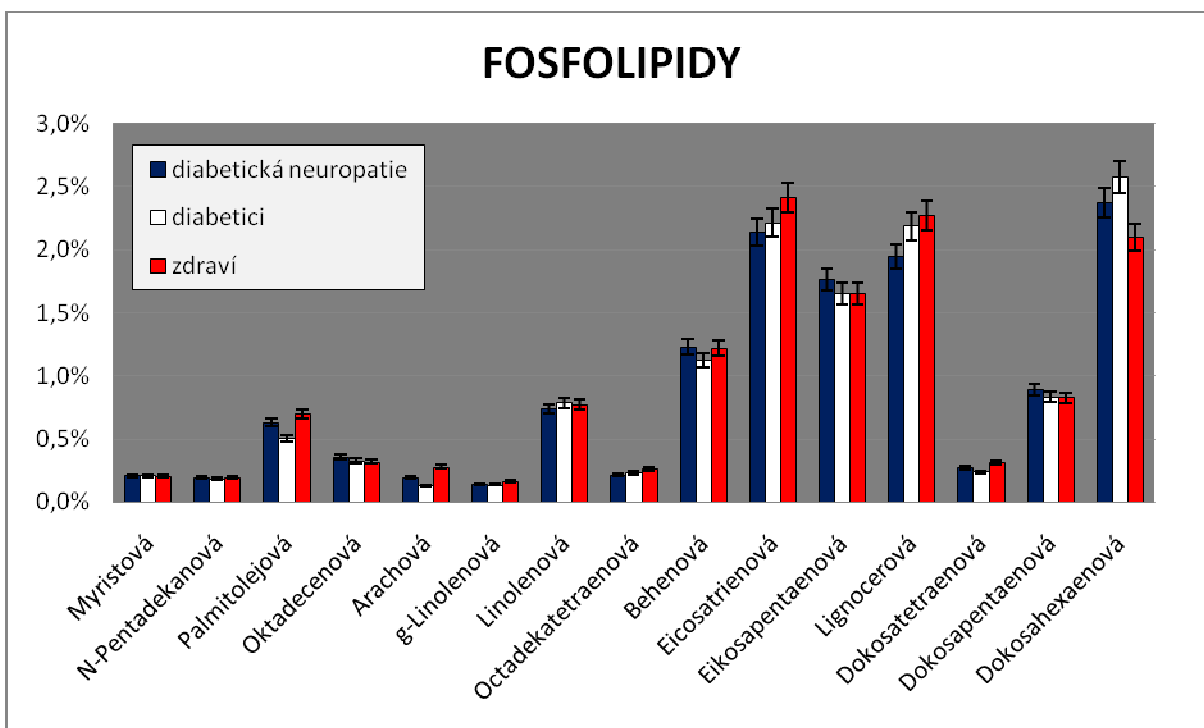
Z naměřených hodnot jsem vypočítala průměrné hodnoty pro jednotlivé mastné kyseliny v každé skupině. Poté jsem sestrojila grafy pro skupinu fosfolipidů, triacylglycerolů, volných mastných kyselin a esterů cholesterolu. Pro lepší rozlišení jsem ještě sestrojila přehlednější grafy, do kterých jsem umístila mastné kyseliny s podobným procentickým zastoupením.



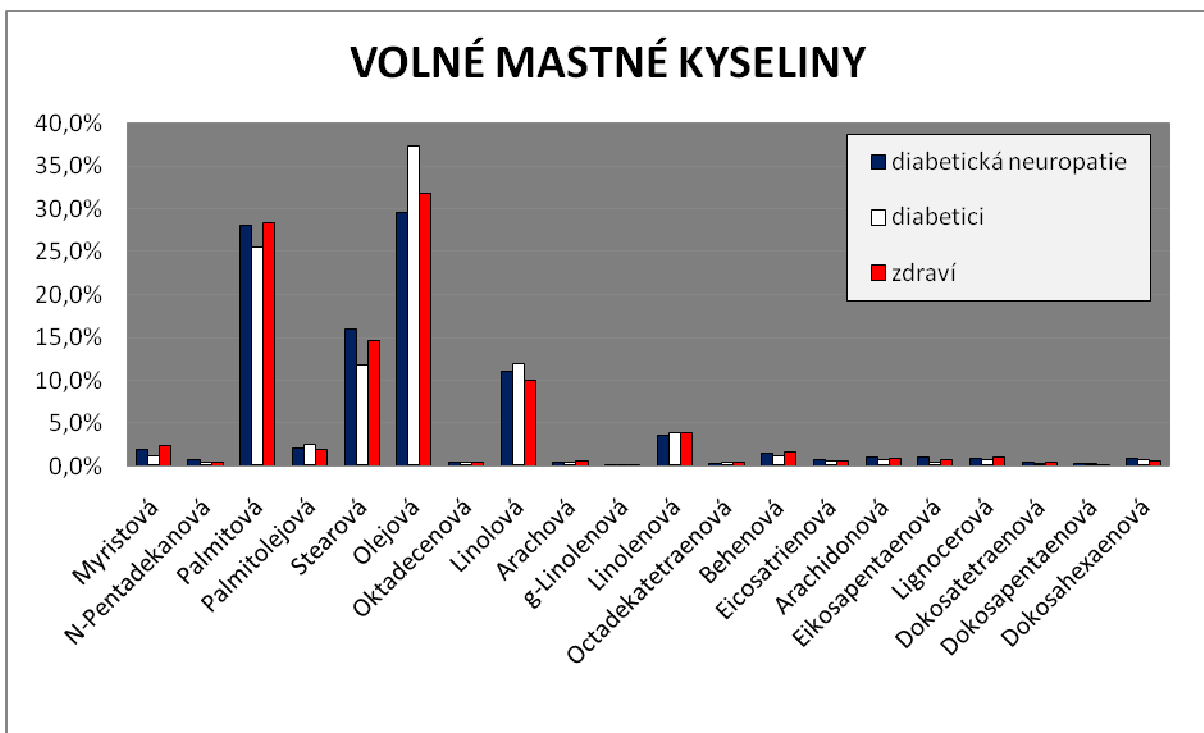
**Graf 5.1** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



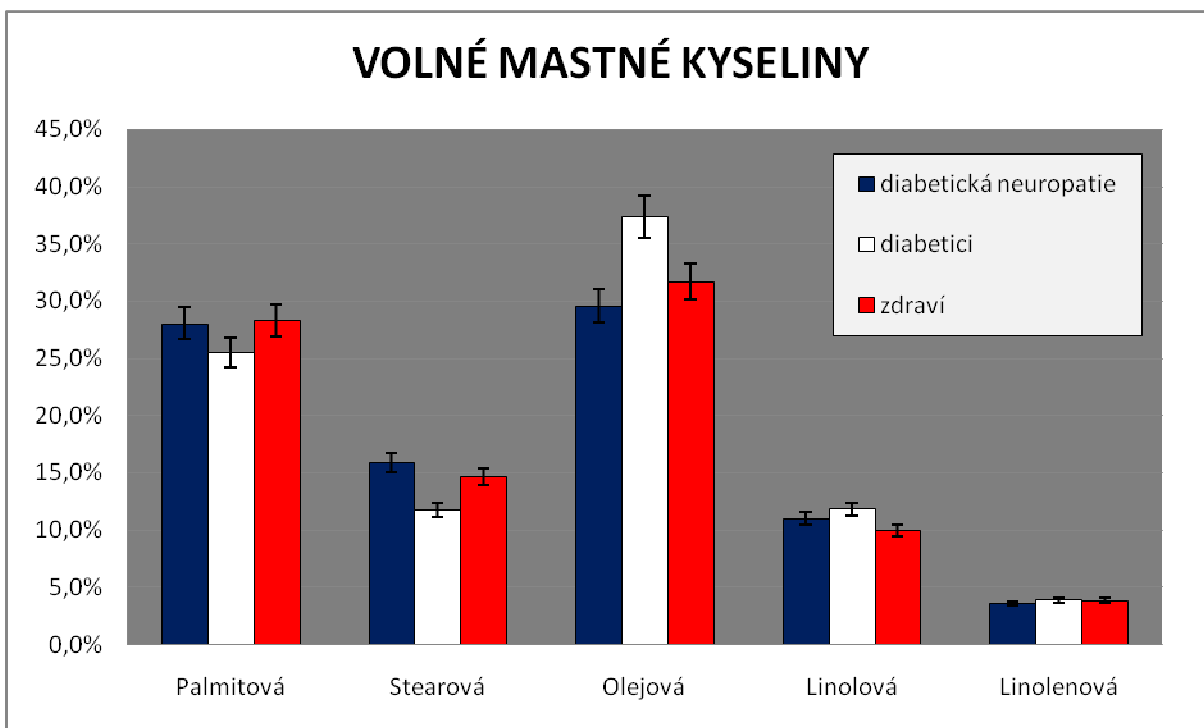
**Graf 5.2** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě fosfolipidů u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



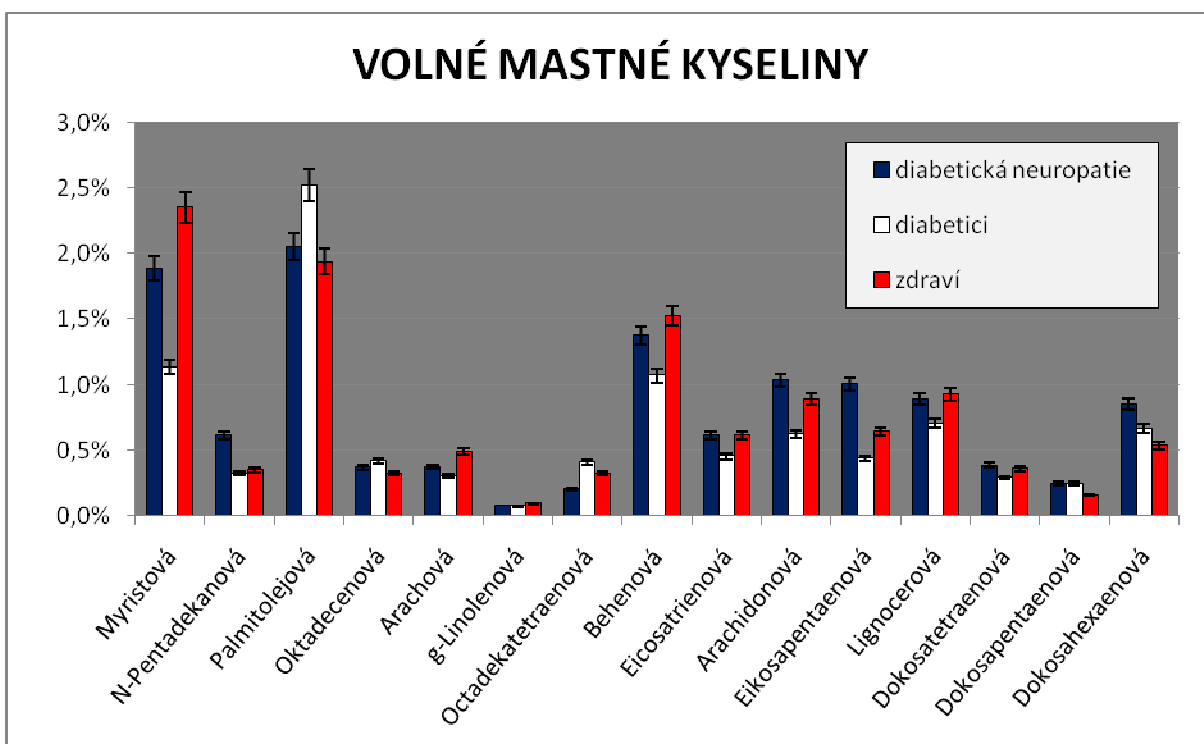
**Graf 5.3** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě fosfolipidů u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



**Graf 5.4** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob

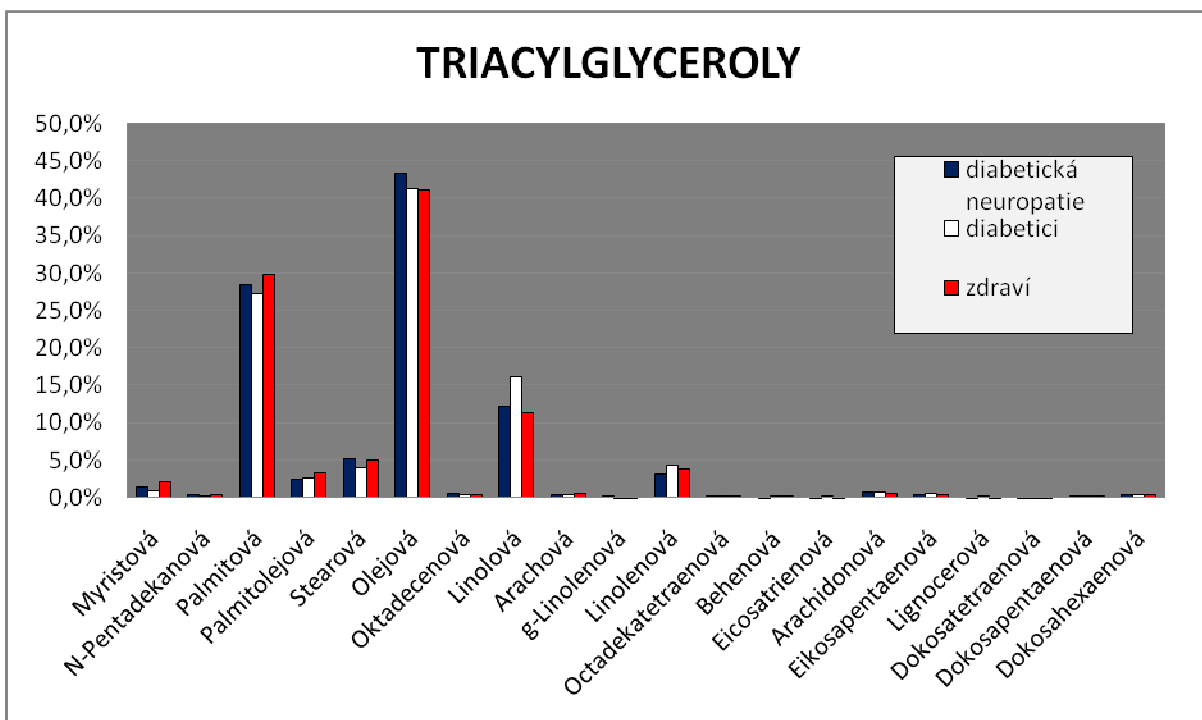


**Graf 5.5** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě volných mastných kyselin u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob

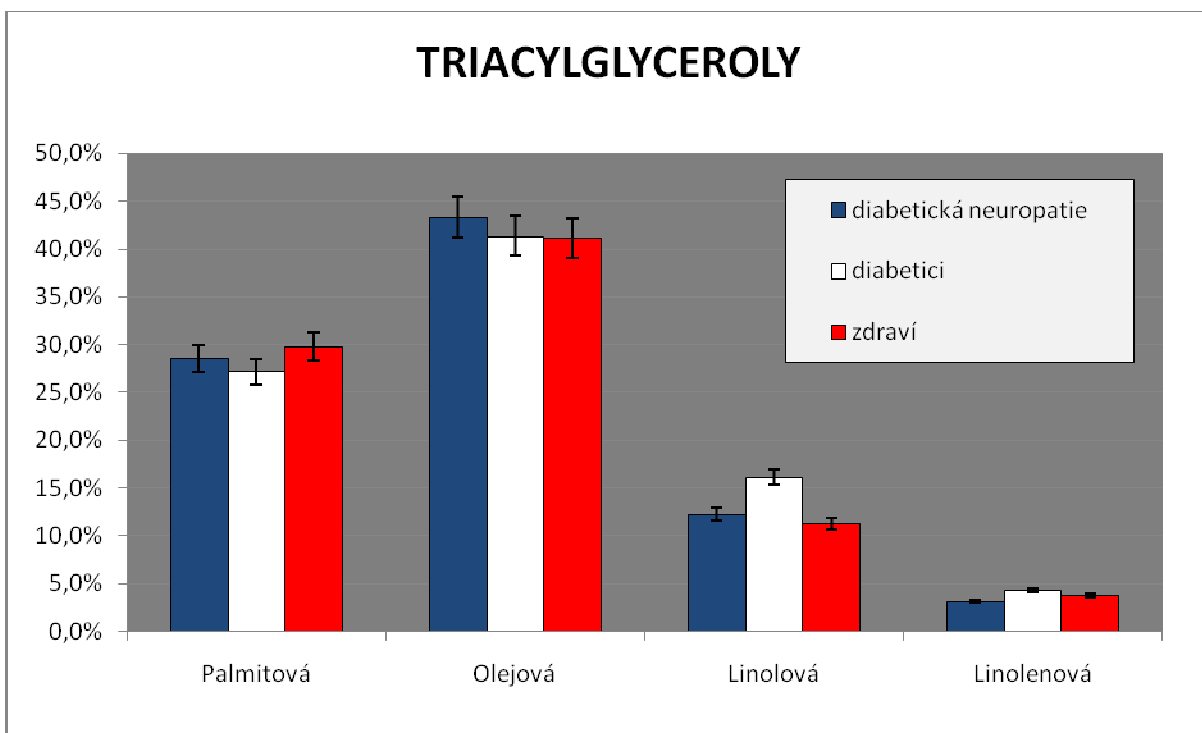


**Graf 5.6** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě volných mastných kyselin u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob

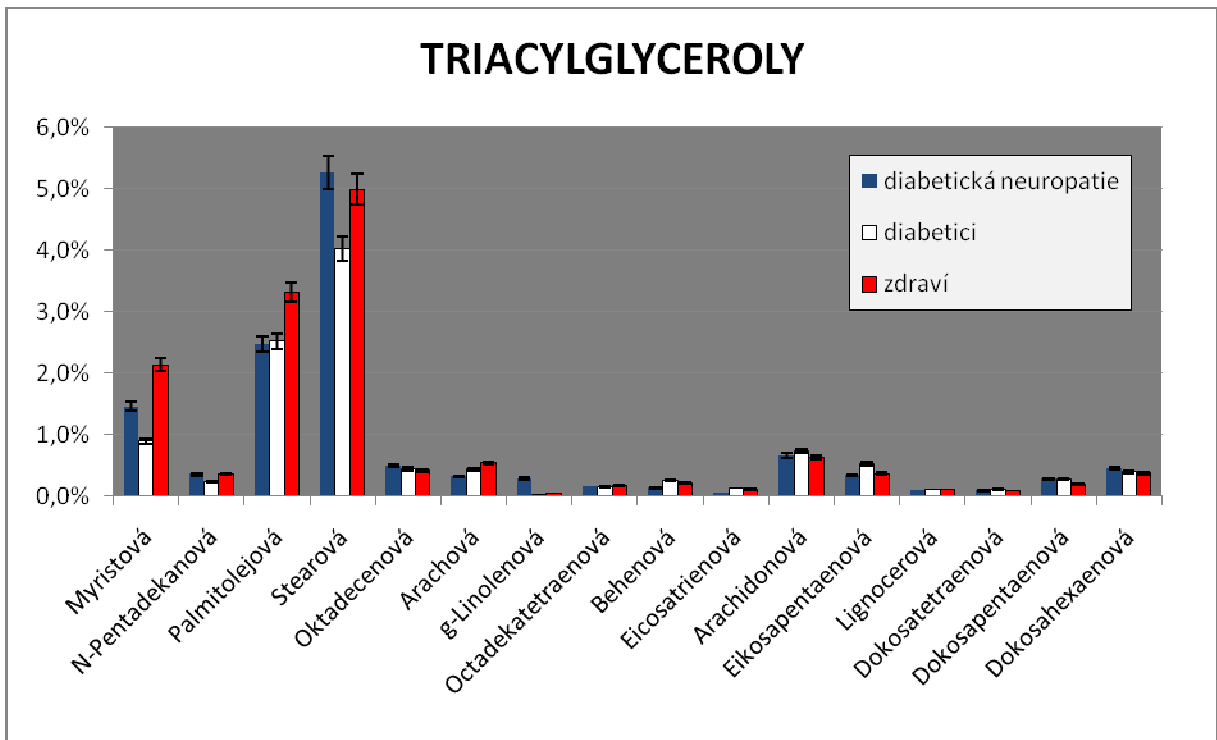




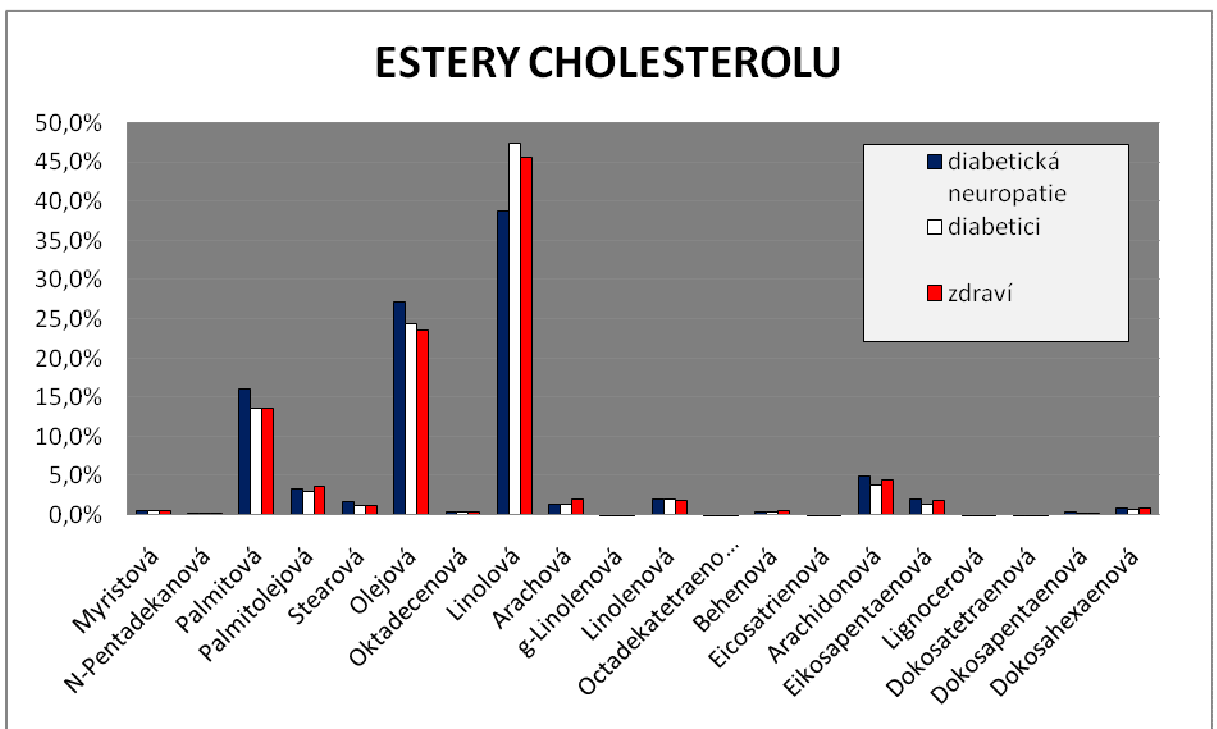
**Graf 5.7** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



**Graf 5.8** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě triacylglycerolů u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



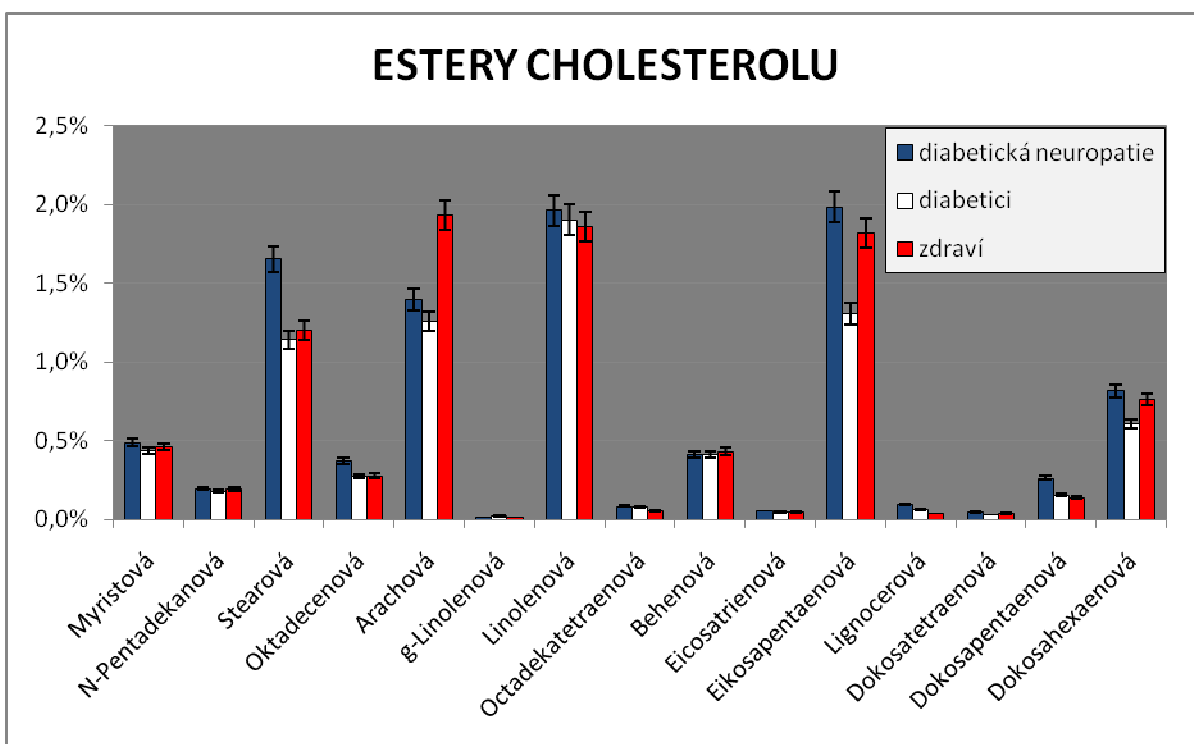
**Graf 5.9** Průměrné procentické zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě triacylglycerolů u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



**Graf 5.10** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



**Graf 5.11** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě esterů cholesterolu u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob



**Graf 5.12** Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě esterů cholesterolu u diabetické neuropatie, diabetiků a zdravých osob

## 6 Diskuze

Diabetická polyneuropatie se do povědomí lékařů dostává již během 19. století. Autonorní polyneuropatie byla odhalena až ve 20. století. V roce 1864 Marchal de Calvi jako první popsal neurologický diabetes, který dnes nazýváme diabetická polyneuropatie (Hotta a spol., 1995).

Ve většině literárních zdrojů se autoři shodují, že diabetická polyneuropatie je nejčastější mikrovaskulární chronickou komplikací provázející diabetes mellitus (Bartoušek, 2001; Olšovský, 2006). Téměř každý diabetik s trváním nemoci nad 10 let má známky diabetické polyneuropatie. Ta postihuje všechny druhy periferních nervů, převážně ale nervy senzitivní (Ambler a spol, 2001). Toto postižení vzniká hromaděním sorbitolu a fruktózy v následku hyperglykémie a podílí se na ní také mikroangiopatické změny cév, které zásobují nervovou tkáň (internet 3).

Nejrozšířenější formou diabetické polyneuropatie je postižení senzitivního nervstva. Nejčastěji se projevuje jako brnění, mravenčení, poruchou citlivosti a sníženou citlivostí na zevní smyslové podněty. Postižení motorických nervů vede k motorickým poruchám, svalové atrofii a snížení výbavnosti reflexů.

Velmi zálučné z hlediska rozpoznání je postižení autonorní nervové soustavy. Projevy jsou determinovány poruchou sympatické či parasympatické inervace jednotlivých orgánů: Kardiovaskulární (náhlá smrt, snížení variability tepové frekvence,...), gastrointestinální (průjmy, poruchy evakuace žaludku), sexuální dysfunkce, pocení horní poloviny těla a dalšími nespecifickými potížemi.

To, zda pacient má či nemá diabetickou polyneuropatii zjistíme podrobným vyšetřením (Rybka, 2007; Bartoušek, 2001; Olšovský, 2006; Vondrová, 2008). Vyšetření se skládá z anamnézy, základního neurologického vyšetření (reflexy, citlivost a dotek, vibrační vjemy – ladička, citlivost na teplo a chlad – zkumavky s teplou a chladnou vodou), testů na autonorní neuropatii (tzv. Ewingovy testy – změna tepové frekvence v závislosti na dýchání, na Valsalvově manévru a na změně polohy, nověji též spektrální analýza), EMG (internet 4).

V mnoha studiích se zabývají tím, zda je možné diabetickou polyneuropatii stanovit pomocí laboratorní diagnostiky a určit přesný marker pro její stanovení. Jelikož je etiologie diabetické polyneuropatie velmi komplikovaná, je také složité najít látku, která by pro toto stanovení byla vhodná.

Dva hlavní patogenetické vlivy vzniku diabetické polyneuropatie jsou vysvětlovány zvýšenou glykemií a následnými poruchami lipidového metabolismu v játrech. Nadbytkem glukózy dochází k nahromadění z ní vzniklého sorbitolu v nervových vláknech a následnou inhibicí tvorby myoinositolu a fosfoinositolu, které jsou potřebné k regeneraci fosfomyelinové nervové membrány. Nadbytek glukózy v jaterních buňkách vede k inhibici delta-6-desaturázy, která katalyzuje přeměnu kyseliny linolové na kyselinu gama-linolenovou. Ta je nezbytná k tvorbě řady vasoaktivních prostaglandinů a dochází ke snížení syntézy prostacyklinu, který rozšiřuje cévy a brání vzniku trombózy (Hotta, 1995).

Během uplynulých deseti let byly vytvořeny experimentální modely, které se zabývaly vlivem omega-6-esenciálních kyselin na etiologii nervové dysfunkce při diabetes mellitus. Hlavní vliv souvisí s abnormální syntézou prostaglandinů, které přispívají ke zhoršení nervové perfuze (Cameron, Cotter, 1996).

Z celkového množství vázaných mastných kyselin v krvi je 45 % obsaženo v triacylglycerolech, 35 % ve fosfolipidech, 15% v esterech cholesterolu, volné mastné kyseliny se podílejí méně než 5 % (Murray, 2002). Nejvyšší podíl mastných kyselin představují triacylglyceroly, které jsou hlavní zásobní formou mastných kyselin syntetizovaných v játrech. Fosfolipidy jsou hlavní lipidovou součástí buněčných membrán. Jelikož při diabetické polyneuropatii dochází k degradaci nervových vláken, mohla by se diabetická polyneuropatie projevit zvýšenou koncentrací fosfolipidů v krvi.

Z našich výsledků je zřejmé, že ve frakci fosfolipidů a triacylglycerolů dochází u pacientů s diabetickou polyneuropatií ke zvyšování koncentrace kyseliny palmitové v závislosti na rostoucí koncentraci glukózy. U pacientů s diabetes mellitus a zdravých osob se tento nárůst koncentrace kyseliny palmitové neprojevuje. Dále dochází v obou frakcích k poklesu koncentrace kyseliny linolové v závislosti na koncentraci glukózy. Z literatury je znám toxický vliv kyseliny palmitové na beta buňky pankreatu, který je považován za velmi významný faktor vzniku a rozvoje diabetu (Laychock, 1983).

Průměrné hodnoty delta-6-desaturázy nevykazují velké rozdíly mezi pacienty s diabetickou neuropatií, s diabetes mellitus a zdravými osobami (11,25; 11,38; 13,55) a tomu odpovídá i průměrné zastoupení nenasycených mastných kyselin – kyseliny gama-linolenové, eikosatrienové, arachidonové a linolové. U všech skupin je mírně odlišné, ale v souladu s literárními údaji (Peter 2008, Peter 2009).

Z výsledků analýzy složení triacylglycerolové frakce vrstvy VLDL je patrné rozdílné snížení aktivity 9-desaturázy u pacientů s diabetickou polyneuropatií a s diabetes mellitus (7,23; 9,39) ve srovnání se zdravou skupinou osob (12,55). Tento jaterní enzym odstraňuje

kyselinu palmitovou z krevního oběhu, zajišťuje její transformaci na kyselinu palmitoolejovou a jeho aktivitu zjistíme z poměru uvedených kyselin, protože převážné množství krevních triacylglycerolů pochází z jaterní syntézy. Je proto možné považovat hodnotu 9-desaturázy za marker poškození jaterních enzymů lipidového metabolismu u výše uvedených onemocnění. Podobné nálezy byly v minulém roce publikovány u nekompenzovaných diabetiků a byl prokázán i přímý vliv na inzulinovou rezistenci periferních svalových buněk (Stefan, 2008).

Výše uvedený nález, dokazující že aktivita 9-desaturázy je více snížena u diabetické neuropatie než u diabetu bez neurologických komplikací může přinést i další zlepšení diagnostiky diabetické polyneuropatie a lepší kontrolu postupu léčby. Opakovaným vyšetřením pacientů bude možné sledovat změny lipidového metabolismu, které většina autorů považuje za důležitý faktor při vzniku a progresi diabetické polyneuropatie.

Tyto nově získané informace rozšiřují naše dosavadní znalosti o laboratorní diagnostice diabetické polyneuropatie.

## 7 Závěr

V této práci bylo analyzováno 15 vzorků EDTA plazmy – 5 vzorků od pacientů s diabetickou polyneuropatií, 5 vzorků od pacientů s diabetem a 5 vzorků od zdravých osob. Pomocí tenkovrstvé chromatografie jsme získali frakce jednotlivých tříd lipidů a v nich pomocí plynové chromatografie stanovili zastoupení mastných kyselin.

Nejvyšší podíl mastných kyselin představují triacylglyceroly, které jsou hlavní zásobní formou mastných kyselin syntetizovaných v játrech. Fosfolipidy jsou hlavní lipidovou součástí buněčných membrán. Jelikož při diabetické polyneuropatii dochází k degradaci nervových vláken, mohla by se diabetická polyneuropatie projevit zvýšenou koncentrací fosfolipidů v krvi.

Z našich výsledků je zřejmé, že ve frakci fosfolipidů a triacylglycerolů dochází u pacientů s diabetickou polyneuropatií ke zvyšování koncentrace kyseliny palmitové v závislosti na rostoucí koncentraci glukózy. U pacientů s diabetes mellitus a zdravých osob se tento nárůst koncentrace kyseliny palmitové neprojevuje. V obou frakcích také dochází k poklesu koncentrace kyseliny linolové v závislosti na koncentraci glukózy.

Z výsledků analýzy složení triacylglycerolové frakce vrstvy VLDL je patrné rozdílné snížení aktivity 9-desaturázy u pacientů s diabetickou polyneuropatií a s diabetes mellitus ve srovnání se zdravou skupinou osob. Díky tomu můžeme považovat hodnotu 9-desaturázy za marker poškození jaterních enzymů lipidového metabolismu u výše uvedených onemocnění.

Výše uvedený nález, dokazující že aktivita 9-desaturázy je více snížena u diabetické polyneuropatie než u diabetu bez neurologických komplikací a toto zjištění může přinést i další zlepšení diagnostiky diabetické polyneuropatie a lepší kontrolu postupu léčby.

## 8 Literatura

- Ambler Z., Bednařík J., Keller O., (2001) Polyneuropatie, doporučené postupy. Projekt MZ ČR.
- Bartoušek J., (2001) Diabetická polyneuropatie v ambulanci praktického lékaře, diabetologa a neurologa – současné možnosti diagnostiky a léčby, Neurologie pro praxi 1, 9 – 14.
- Bartoušek J., (2002) Polyneuropatie – diagnostika a léčba, Interní medicína pro praxi 10, 504 – 510.
- Cameron N. E., Cotter M. A. (1996) Comparison of the effects of ascorbyl  $\gamma$ -linolenic acid and  $\gamma$ -linolenic acid in the correction of neurovascular deficits in diabetic rats. Diabetologia 39, 1047-1054.
- Gasparič J., Churáček J., (1981) Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, laboratorní příručka. SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha, 11-12.
- Hotta N., Greene D. A., Ward J. D., Sima A. A. F., Boulton A. J. M., (1995) Diabetic neuropathy: new concepts and insights, Proceedings of the 3rd International Symposium on Diabetic Neuropathy, Kanagawa, 3-5 November 1994, Elsevier, ISBN 0 444 82098 1.
- Junqueira L. C ., Carneiro J. ,Kelley O. R., (1997) Základy histologie, 7. vydání, Nakladatelství a vydavatelství H & H, str. 303 – 318, ISBN 80-85787-37-7.
- Karlson P., Gerok W., Gross W., (1987) Pathobiochemie, 2. vydání, ACADEMIA nakladatelství ČSAV Praha , 252.
- Laychock S. G., (1983) Fatty acid incorporation in phospholipids of isolated pancreatic islets of the rat. Relationship to insulin release, Diabetes, Vol. 32, Issue 1, 6-13.
- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., (2002) Harperova biochemie, 4. Vydání, Jinočany, Nakladatelství a vydavatelství H & H, 148 – 160. ISBN 80-7319-013-3.



- Olšovský J., (2006) Terapie diabetické neuropatie, Interní medicína pro praxi 11, 476 – 481.
- Perušičová J., Anděl M., (1999) Diabetes mellitus a poruchy metabolismu lipidů, Nakladatelství Galén, 19-25, ISBN 80-7262-050-9.
- Peter A., Weigert C., Staiger H., Čegan A., Rittig K., Lutz P., Machicao F., Häring H-U., Schleicher E., (2008) Induction of stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. Am.J.Physiol: Endocrinology and Metabolism 295, E339-E349.
- Peter A., Čegan A., Wagner S., Lehmann R., Stefan N., Königsrainer A., Königsrainer I., Häring H., Schleicher E., (2009) Hepatic lipid composition and Stearoyl-CoA desaturase (SCD1) mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios. Clinical Chemistry (zasláno k oponentuře – CLINCHEM/2009/127274).
- Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček V., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senft V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M., (2006) Klinická biochemie, Galén, druhé přepracované vydání, ISBN 80-7262-324-9.
- Rybka J., (2007) Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění, Diagnostické a léčebné postupy, Grada Publishing, a.s., ISBN 978-80-247-1671-8.
- Soška Vladimír, (2001) Poruchy metabolismu lipidů, diagnostika a léčba, Grada Publishing, spol. s r.o., první vydání Praha, 13.
- Stefan N., Peter A., Čegan A., Staiger H., Machann J., Schick F., Claussen C.D., Fritsche, A., Häring H-U., Schleicher E., (2008) Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese subjects. Diabetologia 51, 641 – 656.
- Szabó M., (2001) Diabetická dyslipidémie – co přináší nová doporučení?, Interní medicína pro praxi 10, 457 – 458.
- Štern P., Bezdíčková D., Brodská H., Čegan A., Hyánek J., Kazda A., Kocna P., Kubač P., Kubíček Z., Mrázová K., Pelouch V., Schneiderka P., Skalický J.,

- Šebesta I., Trnková B., Vítek L., Zima T., (2005) Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Nakladatelství Karolinum, ISBN 80-246-1025-6.
- Trojan S., Langmeier M., Hrachovina V., Kittnar O., Koudelová J., Kuthan V., Mareš J., Marešová D., Mourek J., Pokorný J., Sedláček J., Schreiber M., Trávníčková E., Wunsch Z. (2003) Lékařská fyziologie, 4. Vydání, Praha, Grada Publishing,a.s., str. 415, ISBN 80-247-0512-5.
  - Tvrzická E., Staňková B., Vecka M., Žák A., (2009) Mastné kyseliny, 1. Výskyt a biologický význam, Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika, Časopis lékařů českých 148: 16-24.
  - Voet D., Voetová J. G., (1995) Biochemie, Victoria Publishing a.s., Praha, ISBN 80-85605-44-9.
  - Vondrová H., (2008) Léčba diabetické polyneuropatie, Neurologie pro praxi; 9(4), 245-251.
  - Vrablík M., Češka R., (2003) Sekundární dyslipoproteinémie, Interní medicína pro praxi 6, 285 – 290.
  - Zamrazil V., Vondra K., Šimečková A., (1997) Časná stadia diabetes mellitus, diagnostika, prevence, perspektivy léčby, MAXDORF, JESSENIUS, 64-65, ISBN 80-85800-74-8.
  - [internet 1] <http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/detail.php?id=161607>, publikováno: 18.6.2004, [citováno 19.4.2009].
  - [internet 2] <http://www.privamed.cz/PDF/Pokyny/O-OGTT.pdf> [citováno 19.4.2009].
  - [internet 3] [http://www.pharmanews.cz/2005\\_03/diabetes.htm](http://www.pharmanews.cz/2005_03/diabetes.htm) [citováno 27.4.2009].
  - [internet 4] [www.elpida.cz/download/diabetes.doc](http://www.elpida.cz/download/diabetes.doc) [citováno 27.4.2009].

## 9 Přílohy

### 9.1 Hodnoty potřebné pro sestavení grafů 5.1 – 5.12

	fosfolipidy			VMK		
	DN	D	Z	DN	D	Z
Myristová	0,209%	0,210%	0,204%	1,89%	1,14%	2,36%
N-Pentadekanová	0,196%	0,183%	0,194%	0,62%	0,32%	0,35%
Palmitová	32,695%	32,787%	31,250%	28,02%	25,51%	28,31%
Palmitolejová	0,627%	0,509%	0,699%	2,06%	2,52%	1,94%
Stearová	16,798%	16,284%	17,942%	15,88%	11,73%	14,64%
Olejová	13,139%	12,577%	13,056%	29,56%	37,38%	31,71%
Oktadecenová	0,356%	0,326%	0,317%	0,37%	0,42%	0,33%
Linolová	17,802%	19,584%	17,838%	10,98%	11,82%	9,98%
Arachová	0,194%	0,130%	0,278%	0,37%	0,30%	0,49%
g-Linolenová	0,141%	0,136%	0,162%	0,08%	0,07%	0,09%
Linolenová	0,740%	0,786%	0,774%	3,57%	3,87%	3,84%
Octadekatetraenová	0,216%	0,230%	0,263%	0,20%	0,41%	0,32%
Behenová	1,231%	1,123%	1,221%	1,38%	1,07%	1,53%
Eicosatrienová	2,138%	2,212%	2,413%	0,61%	0,45%	0,61%
Arachidonová	6,276%	5,438%	6,228%	1,03%	0,63%	0,89%
Eikosapentaenová	1,765%	1,653%	1,652%	1,00%	0,44%	0,64%
Lignocerová	1,944%	2,186%	2,271%	0,89%	0,71%	0,92%
Dokosatetraenová	0,272%	0,238%	0,310%	0,39%	0,29%	0,36%
Dokosapentaenová	0,888%	0,832%	0,828%	0,25%	0,24%	0,16%
Dokosahexaenová	2,374%	2,576%	2,100%	0,85%	0,67%	0,54%

Tabulka 9.1a Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin

	triacylglyceroly			estery cholesterolu		
	DN	D	Z	DN	D	Z
Myristová	1,45%	0,89%	2,13%	0,49%	0,44%	0,46%
N-Pentadekanová	0,35%	0,24%	0,36%	0,20%	0,18%	0,19%
Palmitová	28,49%	27,16%	29,82%	15,99%	13,62%	13,56%
Palmitolejová	2,46%	2,52%	3,32%	3,33%	2,97%	3,63%
Stearová	5,26%	4,03%	4,99%	1,65%	1,14%	1,20%
Olejová	43,31%	41,34%	41,15%	27,20%	24,30%	23,60%
Oktadecenová	0,49%	0,44%	0,42%	0,37%	0,27%	0,28%
Linolová	12,25%	16,08%	11,28%	38,72%	47,35%	45,58%
Arachová	0,32%	0,43%	0,53%	1,40%	1,26%	1,93%
g-Linolenová	0,28%	0,02%	0,05%	0,01%	0,02%	0,02%
Linolenová	3,15%	4,24%	3,75%	1,96%	1,90%	1,86%
Octadekatetraenová	0,14%	0,15%	0,16%	0,08%	0,08%	0,06%
Behenová	0,12%	0,24%	0,21%	0,42%	0,42%	0,43%
Eicosatrienová	0,05%	0,12%	0,10%	0,06%	0,05%	0,05%
Arachidonová	0,66%	0,73%	0,62%	4,91%	3,84%	4,35%
Eikosapentaenová	0,33%	0,52%	0,36%	1,98%	1,31%	1,82%
Lignocerová	0,09%	0,11%	0,11%	0,09%	0,06%	0,04%
Dokosatetraenová	0,08%	0,10%	0,08%	0,05%	0,03%	0,04%
Dokosapentaenová	0,27%	0,26%	0,19%	0,26%	0,16%	0,14%
Dokosahexaenová	0,45%	0,39%	0,37%	0,82%	0,61%	0,76%

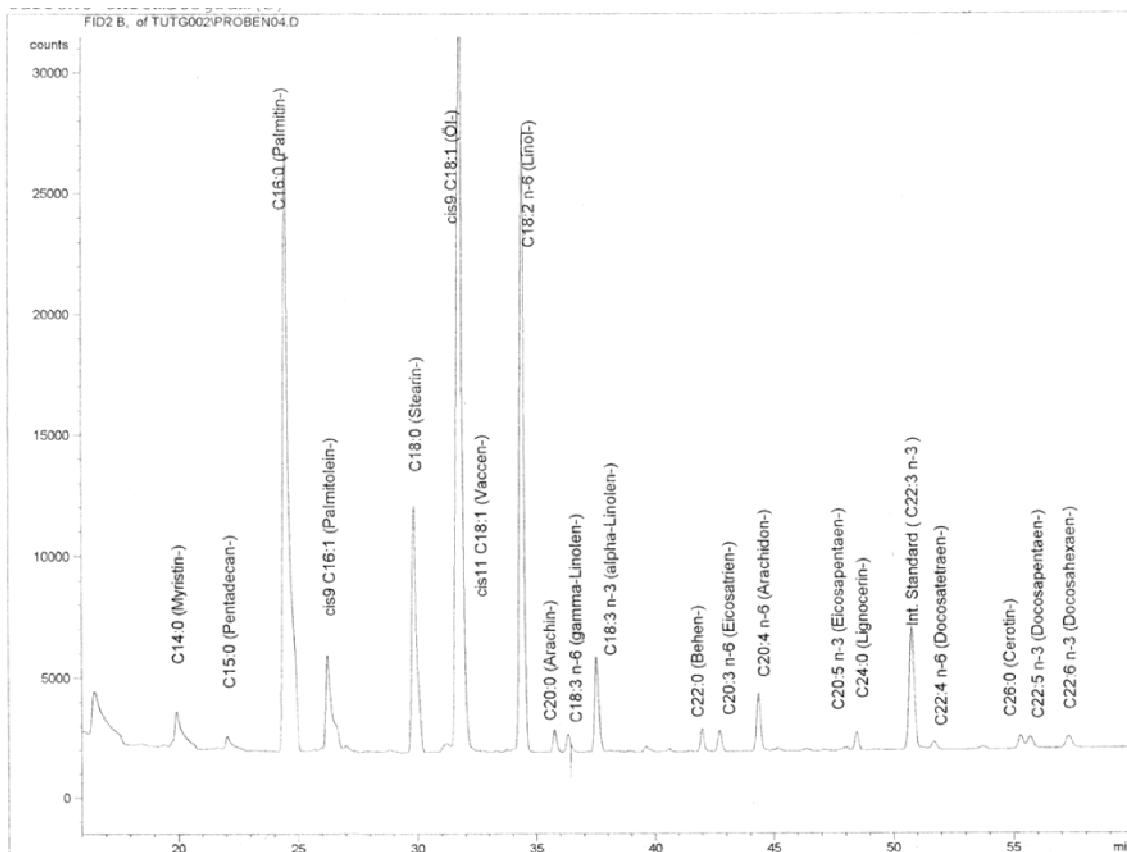
Tabulka 9.1b Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin

## 9.2 Zásobní kalibrační roztok mastných kyselin

### ZÁSObNÍ KALIBRAČNÍ ROZTOK MASTNÝCH KYSELIN

n	Název kyseliny	Vzorec	m <sub>NAVÁŽKA</sub> [mg]	V <sub>ROZP.</sub> [ml]	Rozpouštědlo 1:3	c [mg.ml <sup>-1</sup> ]	c [μg.ml <sup>-1</sup> ]	c [μg.ml <sup>-1</sup> ] v zásobním roztoku	V <sub>FFS</sub> [ml] pipetovaný objem FFS do 100 ml odm. banky
1	Myristová	C14:0	1000	100	MeOH/Toluen	10	10000	20	0,2
2	N-Pentadekanová	C15:0	480,46	96	MeOH/Toluen	5	5000	10	0,2
3	Palmitová	C16:0	250	25	MeOH/Toluen	10	10000	300	3
4	Palmitolejová	C16:1 N7	100	25	MeOH/Toluen	4	4000	60	1,5
5	Stearová	C18:0	1000	100	MeOH/Toluen	10	10000	150	1,5
6	Olejová	C18:1 N9	1000	100	MeOH/Toluen	10	10000	300	3
7	Oktadecenová	C18:1 N7	100	25	MeOH/Toluen	4	4000	50	1,25
8	Linolová	C18:2 N6	500	100	MeOH/Toluen	5	5000	200	4
9	Arachová	C20:0	100	100	MeOH/Toluen	1	1000	10	1
10	g-Linolenová	C18:3 N6	100	100	MeOH/Toluen	1	1000	10	1
11	Linoleová	C18:3 N3	500	100	MeOH/Toluen	5	5000	50	1
13	Behenová	C22:0	100	100	MeOH/Toluen	1	1000	10	1
14	Eicosatrienová	C20:3 N6	25	50	MeOH/Toluen	0,5	500	10	2
15	Arachidonová	C20:4 N6	50	100	MeOH/Toluen	0,5	500	20	4
16	Eikosapentaenová	C20:5 N3	10	25	MeOH/Toluen	0,4	400	10	2,5
17	Lignocerová	C24:0	25	25	MeOH/Toluen	1	1000	10	1
18	Dokosatetraenová	C22:4 N6	25	100	MeOH/Toluen	0,25	250	10	4
19	Dokosapentaenová	C22:5 N3	1	25	MeOH/Toluen	0,04	40	8	20
20	Hexacosanová	C26:0	22,22	88,88	MeOH/Toluen	0,25	250	10	4
21	Dokosaheptaenová	C22:6 N3	25	50	MeOH/Toluen	0,5	500	10	2
								SUMA: 58,15 ml	
								doplnit MeOH/Toluen	směsí

## 9.3 Chromatogram plazmatických mastných kyselin



## 9.4 Seznam tabulek , obrázků a grafů

### 9.4.1 Seznam obrázků

- Obr. 3.1 Anatomie jater (pohled zepředu)
- Obr. 3.2 Anatomie jater (pohled zezadu)
- Obr. 3.3 Obecný obrázek lipoproteinu
- Obr. 3.4 Lipoproteinový metabolismus
- Obr. 3.5 Struktura neuronu

### 9.4.2 Seznam tabulek

- Tabulka 3.1 Michiganský dotazník, Modifikace dle Rušavého 1998
- Tabulka 3.2 EMG klasifikace polyneuropatií
- Tabulka 5.1 Koncentrace glukózy, triacylglycerolu a cholesterolu u pacientů s diabetickou polyneuropatií
- Tabulka 5.2 Koncentrace glukózy, triacylglycerolu a cholesterolu u pacientů s diabetes mellitus
- Tabulka 5.3 Koncentrace glukózy, triacylglycerolu a cholesterolu u zdravých osob
- Tabulka 5.4 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u pacientů s diabetickou polyneuropatií
- Tabulka 5.5 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u pacientů s diabetes mellitus
- Tabulka 5.6 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u zdravých osob
- Tabulka 5.7 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u pacientů s diabetickou polyneuropatií
- Tabulka 5.8 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u pacientů s diabetes mellitus
- Tabulka 5.9 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u zdravých osob
- Tabulka 5.10 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u pacientů s diabetickou polyneuropatií
- Tabulka 5.11 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u pacientů s diabetes mellitus

- Tabulka 5.12 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u zdravých osob
- Tabulka 5.13 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u pacientů s diabetickou polyneuropatií
- Tabulka 5.14 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u pacientů s diabetes mellitus
- Tabulka 5.15 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u zdravých osob

### 9.4.3 Seznam grafů

- Graf 5.1 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě fosfolipidů u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.2 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě fosfolipidů u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.3 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě fosfolipidů u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.4 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě volných mastných kyselin u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.5 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě volných mastných kyselin u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.6 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě volných mastných kyselin u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.7 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě triacylglycerolů u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.8 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě triacylglycerolů u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.9 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě triacylglycerolů u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.10 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin ve vrstvě esterů cholesterolu u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob



- Graf 5.11 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s vyšší koncentrací ve vrstvě esterů cholesterolu u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob
- Graf 5.12 Průměrné procentuální zastoupení mastných kyselin s nižší koncentrací ve vrstvě esterů cholesterolu u diabetické polyneuropatie, diabetiků a zdravých osob

#### 9.4.4 Seznam zkratk

EDTA	ethylene diamin tetraacetic acid
VLDL	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě
FA	Mastné kyseliny
PUFA	Vícenenasycené mastné kyseliny
PL	Fosfolipidy
IDL	Lipoproteiny o střední hustotě
LCAT	Lecitin-cholesterolacyltransferáza
CEPT	Cholesteryl-ester transfer protein
IDDM	Diabetes mellitus závislý na inzulinu
NIDDM	Diabetes mellitus nezávislý na inzulinu
GDM	Gestační diabetes mellitus
GLUT4	Glukózový transfer protein
Mg	Hořčík
K	Deaslík
Cl	Chlor
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
LPL	Lipoproteinová lipáza
SREBP-1	Sterol Regulatory Element Binding Protein
CDT	Karbohydrát deficitní transferin
NO	Oxid dusný
oGTT	Orální glukózový toleranční test
EMG	Elektromyograf
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kyselina sírová
KMnO <sub>4</sub>	Manganistan draselný
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Dichroman draselný
UV	Ultrafialové záření
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
RF	Retenční faktor
DG	Diacylglyceroly

TG	Triacylglyceroly
VMK	Volné mastné kyseliny
ECH	Estery cholesterolu
A	Absorbance
F	Zředovací faktor
$K_2CO_3$	Uhličitan draselný
DN	Diabetická neuropatie
D	Diabetici
Z	Zdravé osoby