

VÝZNAM A STANOVENÍ ESENCIÁLNÍCH MASTNÝCH KYSELIN U DIABETIKŮ TYPU 2

KOPČIL MICHAL, LÍBALOVÁ MARTINA a ČEGAN ALEXANDR*

Katedra biologických a biochemických věd

* *Garant*

ÚVOD

Diabetes mellitus může být charakterizován jako skupina chronických heterogenních onemocnění, pro kterou je společným znakem hyperglykemie. Diabetes vzniká díky nedostatečnému účinku inzulínu nebo poruchou jeho sekrece a je následně provázen defektem metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. U nemocných se současně projevují abnormality jako je dislipidemie, hypertenze, centrální obezita a vyšší pohotovost k tvorbě trombů. ¹

Diabetes mellitus se v dnešní době velmi rychle rozvíjí. Tímto onemocněním trpí celosvětově 347 milionů lidí a WHO předvídá, že v roce 2030 to bude sedmá hlavní příčina úmrtí u člověka. ² Právě proto je nutné hledat možné markery poukazující na rozvíjející se diabetes mellitus, hledat látky, které by mohly potlačit rozvoj tohoto onemocnění, nebo dokonce zlepšovat jeho kompenzaci. V tomto směru se v poslední době zkoumají esenciální mastné kyseliny (EFA). Tyto kyseliny jakožto živiny tvoří velkou řadu bioaktivních mediátorů, které působí na velkou skupinu selektivních receptorů. Díky tomu, že se téměř na každé buňce a tkáni vyskytují tyto receptory, mohou ovlivňovat velkou oblast lidské fyziologie. ³ Několika výzkumy, in vivo i in vitro, byl potvrzen pozitivní účinek vícenenasycených mastných kyselin n-3 na metabolismus lipidů a glukosy, neboť jejich vlivem se snižuje koncentrace triacylglycerolů, zvyšuje hladina HDL cholesterolu v plazmě, zvyšuje inzulínová senzitivita a redukuje krevní tlak. ⁴ Nicméně při příjmu potravy je důležitější sledovat poměr n-3 a n-6 vícenenasycených mastných kyselin, protože mezi metabolické účinky kyselin z řady n-6 patří zvýšená syntéza cholesterolu a zvýšená aktivita LDL receptorů. ^{4,5}

Cílem práce tedy bylo zjistit, zda při onemocnění diabetes mellitus 2. typu dochází ke změnám složení esenciálních mastných kyselin, případně jak ovlivňují jeho průběh a jestli je možné tyto změny využít k diagnostice bez nutného dělení vzorků na jednotlivé lipidové frakce.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K analýze bylo použito 21 vzorků plazmy pacientů s onemocněním diabetes mellitus typu 2 a 17 vzorků plazmy od nediabetiků. Jednotlivé vzorky séra (250 μ l) byly deproteinovány přidáním 1,25 ml roztoku o složení 2-propanol, n-heptan a 2M H_3PO_4 (v poměru 40:20:1). Vzniklá směs byla promíchána a 10 minut byla kondicionována při pokojové teplotě. Následně byl přidán 1 ml roztoku interního standardu o koncentraci 10 μ g/ml a 1,5 ml destilované vody. Po následné centrifugaci (10 minut při 3000 otáčkách) byla přepipetována horní organická vrstva do čisté pyrexové zkumavky. Do takto připravených zkumavek bylo vloženo mikromíchadlo a napipetováno 200 μ l acetylchloridu, který zde slouží jako katalyzátor esterifikace. Poté byly zkumavky uzavřeny víčkem, umístěny do termobloku a bylo zapnuto míchání spolu s vyhříváním na 100 °C. Při této teplotě probíhala esterifikační reakce po dobu 1 hodiny.

Po ochlazení na pokojovou teplotu se provedla neutralizace přidáním 5 ml 6% roztoku K_2CO_3 a směs se po přidavku 2 minuty intenzivně třepala a následně centrifugovala 10 minut při 3000 otáčkách. Horní organická fáze byla odpipetována do zkumavky, následně odpařena v digestoři pod dusíkem dosucha. Poté bylo přidáno 100 μ l směsi toluen-methanol (4:1) a vzniklý roztok byl převeden do chromatografických vialek s insertem a uzavřen víčkem.

Vlastní analýza připravených vzorků byla provedena plynovým chromatografem Agilent Technologies 7890A s kolonou HP 88 pro dělení methyl esterů. Teplotní program byl optimalizován s celkovým časem analýzy 120 minut a celé měření probíhalo v módu split v poměru 10:1. Z chromatografického záznamu byly zjišťovány plochy píků pro dané esenciální mastné kyseliny.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejdříve byly vzorky rozděleny do tří skupin, a to na kontrolní skupinu, kompenzované a špatně kompenzované diabetiky 2. typu. Toto rozdělení do skupin je provedeno podle hodnot glykovaného hemoglobinu (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Rozdělení vzorků podle koncentrace glykovaného hemoglobinu

Skupina	Glykovaný hemoglobin [%]
Kontrolní skupina	4,5 – 5,8
Kompenzovaní diabetici 2. typu	5,9 – 7,4
Špatně kompenzovaní diabetici 2. typu	7,5 – 10,6

Různé procentuální zastoupení esenciálních mastných kyselin bylo zkoumáno pomocí t-testu v programu SigmaStat 3.5. Pro každou kyselinu byly sledovány rozdíly jejich obsahu u kontrolní skupiny se skupinou diabetiků a mezi diabetiky navzájem. Statistická významnost je vyjádřena hodnotou p, která byla počítána na hladině významnosti $\alpha \leq 0,050$. Po provedení statistické analýzy získaných dat, jsme zjistili statistickou významnost u kyseliny dokosaheptaenové (C22:6 n-3). Tato kyselina je dvakrát větší u diabetiků (při prozkoumání mediánů) oproti kontrolní skupině. Děje se tak z důvodu ordinované diety a zřejmě jsme natrefili na pacienty, kteří se opravdu stravují správně, neboť kyselina dokosaheptaenová je hlavní složkou rybího oleje. Dále můžeme zmínit kyselinu stearidonovou (C18:4 n-3), která má statisticky významný rozdíl pouze mezi kontrolní skupinou a špatně kompenzovanými diabetiky 2. typu viz Tabulka 2. Pro zjištění dalších statisticky významných rozdílů v obsahu esenciálních mastných kyselin mezi jednotlivými skupinami by bylo vhodné stanovovat kyseliny zvlášť pro každou lipidovou třídu. Z předchozích studií vyplývají lepší závěry, pro praktické využití, pokud jsou vzorky nejprve rozděleny tenkovrstvou chromatografií na lipidové frakce.⁶

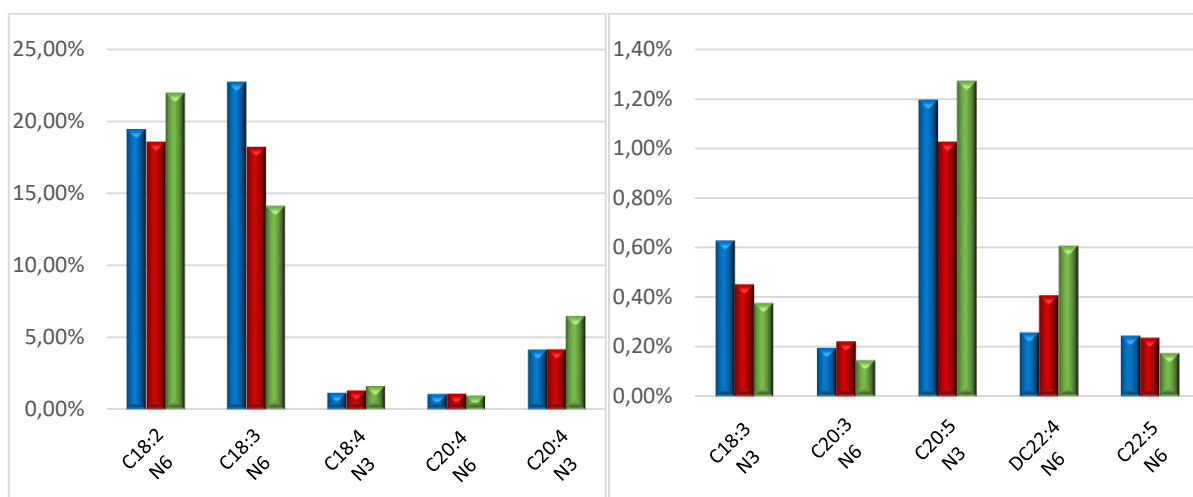
Tabulka 2: Souhrnná výsledková tabulka statistické analýzy pomocí t-testu

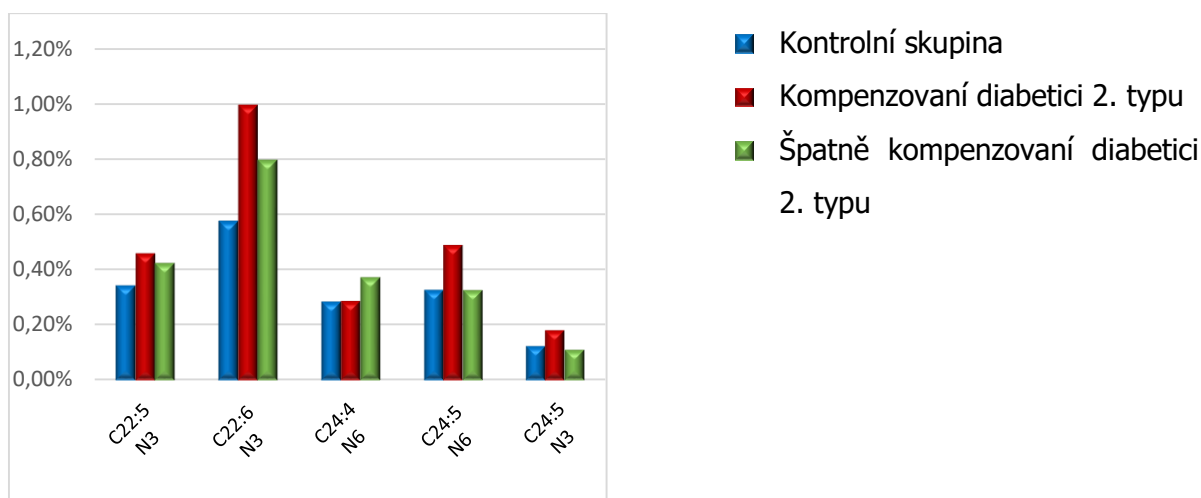
Kyselina	Testované skupiny	p	Závěr	Kyselina	Testované skupiny	p	Závěr
C18:2 N6	K*D	0,647	-	C22:4 N6	K*D	0,223	-
	K*Š	0,239	-		K*Š	0,196	-
	D*Š	0,146	-		D*Š	0,972	-
C18:3 N6	K*D	0,982	-	C22:5 N6	K*D	0,341	-
	K*Š	0,914	-		K*Š	0,484	-
	D*Š	0,438	-		D*Š	0,859	-
C18:3 N3	K*D	0,707	-	C22:5 N3	K*D	0,256	-
	K*Š	0,666	-		K*Š	0,304	-
	D*Š	0,972	-		D*Š	0,798	-
C18:4 N3	K*D	0,223	-	C22:6 N3	K*D	0,003	Významný
	K*Š	0,018	Významný		K*Š	0,031	Významný
	D*Š	0,251	-		D*Š	0,257	-
C20:3 N6	K*D	0,319	-	C24:4 N6	K*D	0,088	-
	K*Š	0,281	-		K*Š	0,215	-
	D*Š	0,166	-		D*Š	0,972	-
C20:4 N6	K*D	0,912	-	C24:5 N6	K*D	0,177	-
	K*Š	0,788	-		K*Š	0,666	-
	D*Š	0,594	-		D*Š	0,271	-

Kyselina	Testované skupiny	p	Závěr	Kyselina	Testované skupiny	p	Závěr
C20:4 N3	K*D	0,997	-	C24:5 N3	K*D	0,088	-
	K*Š	0,077	-		K*Š	0,957	-
	D*Š	0,101	-		D*Š	0,214	-
C20:5 N3	K*D	0,947	-				
	K*Š	0,810	-				
	D*Š	0,348	-				

(K – kontrolní skupina, D – kompenzovaní diabetici 2. typu, Š – špatně kompenzovaní diabetici 2. typu)

Z obrázku 1, který zobrazuje grafy sledující závislost obsahu jednotlivých esenciálních mastných kyselin na stupni onemocnění je patrná poměrně velká proměnlivost jejich obsahu, pokud k tomu navíc zohledníme směrodatné odchylky daných průměrných hodnot EFA (viz Tabulka 3) je tato proměnlivost ještě více umocněna. Takto velké rozdíly mohou být způsobeny zejména díky rozdílnému zastoupení jednotlivých esenciálních mastných kyselin v potravě zkoumaných jedinců. Obsah EFA v potravinách se liší v závislosti na druhu potravin. Nejvyšší obsah esenciálních mastných kyselin z řady n-3 je v tučných rybách jako je losos nebo tuňák, dále jsou obsaženy v sóji nebo lněných semínkách. Naopak esenciální mastné kyseliny z řady n-6 jsou zejména obsaženy v slunečnicových a sezamových semínkách, nižší koncentrace jsou pak v dýňových semínkách, vlašských ořechích a kukuřici. ⁷





Obrázek 1: Grafy průměrných hodnot esenciálních mastných kyselin v závislosti na stupni onemocnění

Tabulka 3: Přehled směrodatných odchylek k daným průměrným hodnotám esenciálních mastných kyselin

Kyselina	Průměr [%]			Směrodatná odchylka [%]		
	K	D	Š	K	D	Š
C18:2 N6	19,45	18,57	21,93	4,82	4,82	4,71
C18:3 N6	22,73	18,20	14,11	22,09	12,50	9,04
C18:4 N3	1,17	1,33	1,63	0,81	0,63	0,42
C20:4 N6	1,07	1,10	0,96	0,61	0,82	0,31
C20:4 N3	4,17	4,16	6,48	2,55	2,34	3,49
C18:3 N3	0,63	0,45	0,38	0,58	0,52	0,26
C20:3 N6	0,20	0,22	0,15	0,14	0,13	0,10
C20:5 N3	1,19	1,02	1,27	0,72	0,33	0,75
C22:4 N6	0,26	0,41	0,61	0,21	0,37	0,83
C22:5 N6	0,25	0,24	0,18	0,27	0,21	0,08
C22:5 N3	0,34	0,46	0,42	0,16	0,36	0,21
C22:6 N3	0,57	0,99	0,79	0,54	0,42	0,28
C24:4 N6	0,28	0,29	0,37	0,55	0,28	0,55
C24:5 N6	0,33	0,49	0,33	0,41	0,47	0,40
C24:5 N3	0,12	0,18	0,11	0,14	0,23	0,11

(K – kontrolní skupina, D – kompenzovaní diabetici 2. typu, Š – špatně kompenzovaní diabetici 2. typu)

ZÁVĚR

Analýze bylo podrobena celkem 38 vzorků, jež byly na základě hodnot koncentrace glykovaného hemoglobinu rozděleny do tří skupin na kompenzované diabetiky (12 vzorků), špatně kompenzované diabetiky (9 vzorků) a kontrolní skupinu (17 vzorků), což jsou jedinci bez diagnostikovaného diabetu. Vzorky byly derivatizovány a ve formě methyl esterů byly analyzovány plynovou chromatografií. Tím byla získána data o obsahu esenciálních mastných kyselin, která byla následně zpracována v programech Microsoft Office Excel 2013 a SigmaStat 3.5.

U studovaných diabetiků byla zjištěna velká proměnlivost naměřených dat u některých mastných kyselin jednotlivých skupin, která je umocňována velkými směrodatnými odchylkami od daných průměrných hodnot esenciálních mastných kyselin, což je způsobeno stravovacími návyky pacientů. Statistickou analýzou získaných dat a vzájemným srovnáním kontrolní skupiny se skupinou diabetiků vyšla statisticky významná pouze kyselina dokosaheptaenová, která je obsažena hlavně v rybách.

LITERATURA

1. Pelikánová T., Bartoš V.: *Praktická diabetologie*. Maxdorf, Praha 2011.
2. Drábková P., Šanderová J., Kovařík J., Kand'ár R.: *Adv. Clin. Exp. Med.* 24, 447 (2015).
3. Lands B.: *Nutrients* 4, 1338 (2012).
4. Wang Y., Huang F.: *BioMed Res. Int.* 2015, online: 3. 8. 2015.
5. Žák A., Macášek J.: *Ateroskleróza: nové pohledy*. Grada, Praha 2011.
6. Schauerová K.: *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2014.
7. Tvrzická E., Kremmyda L., Staňková B., Žák A.: *Biomed. Pap.* 155, 117 (2011).