

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Stanovení a diagnostický význam esenciálních mastných kyselin u diabetiků
typu 2**

Bc. Michal Kopčil

Diplomová práce
2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michal Kopčil**
Osobní číslo: **C16478**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Stanovení a diagnostický význam esenciálních mastných kyselin u diabetiků typu 2**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

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

Experimentální část:

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

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tisknutá**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

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

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

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

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



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 5. 5. 2018

Bc. Michal Kopčil

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu prof. Ing. Alexanderovi Čeganovi, CSc. a konzultantovi Mgr. Radimu Janečkovi za jejich odborné rady, vstřícnost, korekturu a čas, který mi věnovali při řešení této práce.

ABSTRAKT

V rámci této diplomové práce byl zkoumán obsah esenciálních mastných kyselin v plazmě diabetiků a kontrolní skupiny. Byla vytvořena jejich závislost na onemocnění diabetes mellitus 2. typu, které je dáno hladinou glykovaného hemoglobinu (HbA1c). Cílem této práce bylo charakterizovat markery z řad polynenasycených mastných kyselin, které by mohly přispět k včasné diagnostice diabetu.

Vzorky plazmy zdravých dárců a diabetiků 2. typu byly analyzovány dvěma chromatografickými metodami. Nejdříve byla provedena tenkovrstvá chromatografie, na jejíž základě byly plazmatické lipidy rozděleny do pěti lipidových tříd. Následně byla provedena derivatizace na methylestery mastných kyselin a plynovou chromatografií byla stanovena koncentrace jednotlivých mastných kyselin. Tímto způsobem bylo zpracováno 32 vzorků plazmy, které byly rozděleny do dvou skupin podle hodnot glykovaného hemoglobinu (HbA1c) na diabetiky 2. typu a kontrolní skupinu (zdravé dárce).

U sledovaných diabetiků byla zjištěna snížená aktivita $\Delta 5$ -desaturázy, což charakterizuje orgány postižené diabetem v počátku jejich postižení. Naproti tomu byla u diabetiků zjištěna zvýšená aktivita $\Delta 6$ -desaturázy, která souvisí s progresí metabolického syndromu. Statistickou analýzou byly odhaleny čtyři polynenasycené mastné kyseliny, které by se daly použít pro včasnou diagnostiku onemocnění diabetes mellitus 2. typu.

Klíčová slova: esenciální mastné kyseliny, diabetes mellitus, lipidový metabolismus, tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie

ABSTRACT

In this diploma thesis the content of essential fatty acids in the plasma of diabetics and control group was examined. There were evaluated their dependence on type 2 diabetes mellitus, which is determined by the level of glycated hemoglobin (HbA1c). The aim of this work was to characterize markers from polyunsaturated fatty acids that could contribute to the early diagnosis of diabetes.

Plasma samples of healthy donors and type 2 diabetics were analysed by two chromatographic methods. At first, thin layer chromatography was performed and the plasma lipids were divided into five lipid classes. The derivatization of fatty acid into corresponding methyl esters was carried out and the concentration of individual fatty acids was determined by gas chromatography. Thirty two plasma samples were processed in this way. According to the values of glycated hemoglobin (HbA1c), samples were divided into two groups: diabetics of 2type and control group (healthy donors).

Reduced activity of $\Delta 5$ -desaturase was observed within diabetics group. This is characteristic for organs which are affected by diabetes at the beginning of their disability. On the other hand, increased $\Delta 6$ -desaturase activity has been found in diabetics, which is related to the progression of metabolic syndrome. Statistical analysis revealed four polyunsaturated fatty acids that could be used for the early diagnosis of type 2 diabetes mellitus.

Key words: essential fatty acids, diabetes mellitus, lipid metabolism, thin layer chromatography, gas chromatography

Obsah

Seznam ilustrací, grafů a tabulek	11
Seznam zkratk	13
Úvod.....	15
1 Teoretická část	16
1.1 Lipidy	16
1.1.1 Fosfolipidy	16
1.1.2 Triacylglyceroly	17
1.1.3 Mastné kyseliny	17
1.1.3.1 Syntéza mastných kyselin.....	18
1.1.3.2 Odbourávání mastných kyselin	20
1.1.3.3 Nenasycené mastné kyseliny	22
1.1.4 Cholesterol	22
1.2 Pankreas	23
1.2.1 Inzulín	24
1.2.1.1 Biosyntéza a sekrece inzulínu	24
1.2.2 Účinky inzulínu.....	25
1.3 Diabetes mellitus	26
1.3.1 Diabetes mellitus 1. typu	26
1.3.2 Diabetes mellitus 2. typu	27
1.3.3 Inzulínová rezistence	27
1.3.4 Lipidový metabolismus při DM.....	28
1.3.5 Vliv nenasycených a nasycených mastných kyselin.....	30
1.4 Chromatografie	32
1.4.1 Princip chromatografie	32
1.4.2 Rozdělení chromatografických metod	32

1.4.3	Chromatografie na tenké vrstvě	33
1.4.4	Plynová chromatografie	35
1.4.5	Chromatografické metody pro stanovení mastných kyselin.....	39
2	Experimentální část.....	41
2.1	Popis vzorků a jejich rozdělení	41
2.2	Přístrojové vybavení a pomůcky pro TLC a GC.....	41
2.3	Chemikálie a další materiál.....	43
2.4	Postup práce	45
2.4.1	Denaturace bílkovin a extrakce lipidů	45
2.4.2	Chromatografie na tenké vrstvě.....	46
2.4.3	Plynová chromatografie	47
3	Výsledky	49
3.1	Plynová chromatografie	49
3.1.1	2D grafy – obsah jednotlivých mastných kyselin v závislosti na onemocnění ..	49
3.1.1.1	Fosfolipidy.....	50
3.1.1.2	Diacylglyceroly	51
3.1.1.3	Volné mastné kyseliny	52
3.1.1.4	Triacylglyceroly	53
3.1.1.5	Estery cholesterolu	54
3.1.2	Aktivita $\Delta 9$ -desaturázy, $\Delta 5$ -desaturázy a $\Delta 6$ -desaturázy v lipidových frakcích v závislosti na onemocnění	55
3.1.2.1	$\Delta 9$ -desaturáza	55
3.1.2.2	$\Delta 5$ -desaturáza	55
3.1.2.3	$\Delta 6$ -desaturáza	56
3.1.3	Srovnání obsahu mastných kyselin řady n-3 a n-6 u kontrolní skupiny a diabetiků 2. typu.....	57
3.1.4	Bodové grafy – závislost esenciálních mastných kyselin na glykovaném hemoglobinu	57

3.1.4.1	Diacylglycerol	58
3.1.4.2	Volné mastné kyseliny	58
3.1.4.3	Estery cholesterolu	59
3.1.5	Rozdíly koncentrací EFA u jednotlivých skupin	59
4	Diskuze	63
5	Závěr	66
6	Zdroje.....	67
7	Přílohy.....	72

Seznam ilustrací, grafů a tabulek

OBRÁZKY

Obrázek 1 Znázornění syntézy nasycených a nenasycených mastných kyselin	20
Obrázek 2 Transport thioesteru acyl-CoA do mitochondrie	21
Obrázek 3 Sekrece inzulinu	25
Obrázek 4 Schématické znázornění lipotoxicity v souvislosti s metabolickým syndromem	28
Obrázek 5 Výpočet retardačního faktoru	35
Obrázek 6 Schéma plynového chromatografu	36

GRAFY

Graf 1 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve PL	50
Graf 2 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve PL	50
Graf 3 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v DAG	51
Graf 4 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v DAG	51
Graf 5 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve VMK	52
Graf 6 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve VMK	52
Graf 7 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v TAG	53
Graf 8 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v TAG	53
Graf 9 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v ECH	54
Graf 10 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v ECH	54
Graf 11 Průměrná aktivita $\Delta 9$ -desaturázy ve všech lipidových frakcích	55
Graf 12 Průměrná aktivita $\Delta 5$ -desaturázy ve všech lipidových frakcích	56
Graf 13 Průměrná aktivita $\Delta 6$ -desaturázy ve všech lipidových frakcích	56
Graf 14 Celková koncentrace sledovaných n-3 a n-6 EFA v jednotlivých lipidových frakcích	57
Graf 15 Bodový graf kyseliny eikosadienové v závislosti na HbA1c ve frakci DAG	58
Graf 16 Bodový graf kyseliny eikosadienové v závislosti na HbA1c ve frakci VMK	58
Graf 17 Bodový graf kyseliny eikosadienové v závislosti na HbA1c ve frakci ECH	59

TABULKY

Tabulka 1 Rozdělení chromatografických metod	32
Tabulka 2 Rozdělení chromatografických metod dle povahy děje při separaci	33
Tabulka 3 Přehled typických detektorů pro GC	37
Tabulka 4 Rozdělení vzorků podle hladiny glykovaného hemoglobinu	41
Tabulka 5 Použité mastné kyseliny pro statistickou analýzu	49
Tabulka 6 Výsledková tabulka t-testu pro frakci fosfolipidů	60
Tabulka 7 Výsledková tabulka t-testu pro frakci diacylglycerolů	60
Tabulka 8 Výsledková tabulka t-testu pro frakci volných mastných kyselin	61

Tabulka 9 Výsledková tabulka t-testu pro frakci triacylglycerolů.....	61
Tabulka 10 Výsledková tabulka t-testu pro frakci esterů cholesterolu	62
Tabulka 11 Biochemické parametry – diabetici 2. typu	72
Tabulka 12 Biochemické parametry – kontrolní skupina	73
Tabulka 13 Koncentrace MK ve fosfolipidech – kontrolní skupina	74
Tabulka 14 Koncentrace MK ve fosfolipidech – kontrolní skupina	75
Tabulka 15 Koncentrace MK ve fosfolipidech – diabetici 2. typu	76
Tabulka 16 Koncentrace MK ve fosfolipidech – diabetici 2. typu	77
Tabulka 17 Koncentrace MK v diacylglycerolech – kontrolní skupina	78
Tabulka 18 Koncentrace MK v diacylglycerolech – kontrolní skupina	79
Tabulka 19 Koncentrace MK v diacylglycerolech – diabetici 2. typu.....	80
Tabulka 20 Koncentrace MK v diacylglycerolech – diabetici 2. typu.....	81
Tabulka 21 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – kontrolní skupina	82
Tabulka 22 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – kontrolní skupina	83
Tabulka 23 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – diabetici 2. typu	84
Tabulka 24 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – diabetici 2. typu	85
Tabulka 25 Koncentrace MK v triacylglycerolech – kontrolní skupina	86
Tabulka 26 Koncentrace MK v triacylglycerolech – kontrolní skupina	87
Tabulka 27 Koncentrace MK v triacylglycerolech – diabetici 2. typu	88
Tabulka 28 Koncentrace MK v triacylglycerolech – diabetici 2. typu	89
Tabulka 29 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – kontrolní skupina	90
Tabulka 30 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – kontrolní skupina	91
Tabulka 31 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – diabetici 2. typu	92
Tabulka 32 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – diabetici 2. typu	93

Seznam zkratek

AA	arachidonová kyselina
ALA	α -linolenová kyselina
ATGL	adipocytární triglyceridová lipáza
ATP	adenosintrifosfát
CETP	cholesterol-ester transfer protein
DAG	diacylglyceroly
DGLA	dihomo- γ -linolenová kyselina
DHA	dokosahexaenová kyselina
DM	diabetes mellitus
DPA	dokosapentaenová kyselina
EFA	esenciální mastné kyseliny
ECH	ester cholesterolu
EPA	eikosapentaenová kyselina
FAME	methylester mastné kyseliny (fatty acid methylester)
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GLA	γ -linolenová kyselina
GLUT	přenašeč glukosy facilitovanou difúzí
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HLA	lidské leukocytární antigeny (human leukocyte antigens)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSL	hormon senzitivní lipáza
CH	cholesterol
IR	inzulínová rezistence
LA	linolová kyselina
LC/ESI-MS/MS	kapalinová chromatografie/elektrosprej ionizačně tandemová hmotnostní spektrometrie
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LPL	lipoproteinová lipáza
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie

MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
PI-3-K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
SAFA	nasycené mastné kyseliny
TAG	triacylglyceroly
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TNF- α	tumor nekrotizující faktor- α
TOF	analyzátor doby letu
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)
VMK	volné mastné kyseliny

Úvod

Diabetes mellitus je závažné onemocnění, jehož výskyt se každým rokem zvyšuje a stává se tak novodobým problémem vyspělého světa. Jeho rozvoj je spojen s nezdravým životním stylem, jenž je typický pro země západního světa, ve kterých mají lidé špatné stravovací návyky spojené s konzumací vysokokalorických jídel. Spolu s nízkou fyzickou aktivitou, stresem a hektickým životním stylem dochází k nárůstu obézních lidí, čímž se zvyšuje riziko vzniku tohoto onemocnění. Nemocní jsou navíc ohroženi i dalšími onemocněními doprovázející diabetes, jako je ateroskleróza, retinopatie, neuropatie a syndrom diabetické nohy. Diabetes mellitus je rovněž provázen zvýšenou hladinou glykemie a glykovaného hemoglobinu a dochází ke změnám v metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Především rozvrat metabolismu tuků s sebou nese velká rizika, neboť dochází ke změnám metabolismu mastných kyselin, které pak mohou působit prozánětlivě a cytotoxicky.

Z těchto uvedených důvodů je nezbytné hledat markery pro včasnou diagnostiku diabetes mellitus 2. typu nebo případně látky, jež by byly schopny potlačit jeho rozvoj. S ohledem na tuto skutečnost se v současné době zkoumají esenciální mastné kyseliny, a to především kvůli jejich známým účinkům na lidské tělo, respektive kvůli možným změnám v jejich metabolismu. Díky těmto změnám by mohl být eliminován pozdní záchyt onemocnění diabetes mellitus.

1 Teoretická část

1.1 Lipidy

Lipidy vytváří různorodou skupinu důležitých látek, pro niž je společným znakem určitá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech, jako je např. chloroform, benzen nebo ether. Kvůli jejich heterogenní struktuře zastupují v organismu významné funkce. V buňkách jsou obsaženy v biologických membránách, jsou prekurzory pro syntézu hormonů a hlavně slouží jako zdroj energie, buď jako přímý, nebo uschovaný v tukové tkáni do zásoby. Dále se podílí na tepelné izolaci v podkožní tkáni a elektrické izolaci, jež je tvořena nepolárními lipidy a zabezpečuje rychlejší šíření depolarizačních vln myelinizovanými vlákny nervové tkáně. Můžeme je také označit jako významnou složku potravy, neboť obsahují esenciální mastné kyseliny a vitamíny rozpustné v tucích, které jsou obsaženy v lipidové složce stravy (*Murray R., 2002; Ahmed N., 2011*).

Pro třídění a klasifikaci lipidů se nejvíce používají kritéria, která jsou založena na jejich rozpustnosti v nepolárních rozpouštědlech, stejném metabolickém základu, zda obsahují esterifikované mastné kyseliny nebo jestli mají společné, případně podobné využití organismem. Na základě chemické struktury je dělíme do čtyř skupin a to na:

- Mastné kyseliny,
- lipidy, které obsahují glycerol v molekule,
- lipidy neobsahující glycerol,
- lipidy vázané s jinými látkami (*Matouš B., 2010*).

1.1.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy (PL) patří mezi polární (hydrofilní) lipidy, které společně s cholesterolem představují hlavní lipidy lipoproteinového obalu a biologických membrán. Jsou složeny z molekuly glycerolu, na který se většinou v první a druhé poloze váží esterovou vazbou mastné kyseliny. Třetí poloha je obsazena zbytkem kyseliny fosforečné, na niž je připojena jedna ze čtyř různých skupin bází (cholin, ethanolamin, serin a inositol). Jejich syntéza probíhá v endoplazmatickém retikulu jater, kde se sdružují s dalšími lipidy a bílkovinami, čímž vznikají lipoproteiny, jež jsou uvolňovány do krevního oběhu, kdy největší podíl PL je obsažen v HDL (High Density Lipoprotein) částicích. HDL částice jsou z počátku vylučovány z jater a ze střeva jako

pre-HDL, jež se v oběhu po získání PL a cholesterolu z chylomikronů mění na diskoidní HDL (*Hodson L., 2008*).

Složení a obsah jednotlivých PL v lipoproteinovém obalu je pro hlavní třídu lipoproteinů obdobný s výjimkou chylomikronů. V plazmě se v nejvyšších koncentracích vyskytuje fosfatidylcholin (PL s lecitinem), méně pak sfingomyelin. Minoritními fosfolipidy v plazmě jsou fosfatidylserin a fosfatidylinositol. Plazmový fosfatidylcholin obsahuje ze všech mastných kyselin nejvíce kyselinu palmitovou (30 %), ta je následována kyselinou linolovou (25 %), stearovou (14 %) a v menším množství olejovou a arachidonovou kyselinou. Tento obsah mastných kyselin PL v plazmě odpovídá přibližně fosfolipidům buněčné membrány (*Tvrzická E., 2011*).

1.1.2 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly (TAG) se skládají z glycerolu, na který se esterovou vazbou vážou tři zbytky mastných kyselin. Ty mohou být všechny tři stejné, což se u přírodních tuků vyskytuje pouze zřídka, nebo jsou dané MK rozdílné, kdy se na druhý uhlík glycerolu většinou váže nenasycená mastná kyselina (*Řezáčová M., 2008*). Obsazení nenasycených mastných kyselin v TAG má za následek snížení bodu tání tzn., že tyto TAG budou při pokojové teplotě kapalné. Nejčastěji vázané MK v TAG jsou kyselina olejová, palmitová a linolová (*Tvrzická E., 2011*).

TAG mají neutrální charakter a nemají náboj. Dále jsou důležitým zdrojem energie, resp. mastné kyseliny, které obsahují, a díky tomu se TAG ukládají do adipocytů v tukové tkáni, kde slouží jako význačný rezervoár energie a jsou zde neustále syntetizovány a odbourávány (*Matouš B., 2010*).

1.1.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou jednoduché uhlíkaté řetězce, které na svém konci mají karboxylovou skupinu (-COOH). Na základě délky řetězce se dělí na MK s krátkým řetězcem (obsahují 4-6 uhlíkových atomů), MK se středně dlouhým řetězcem (obsahují 8-12 uhlíkových atomů) a MK s dlouhým řetězcem, které mají více než 12 uhlíkových atomů v molekule, kdy v naší potravě jsou obsaženy převážně MK s dlouhým řetězcem. Avšak MK, jež mají velký počet atomů uhlíku, nejsou zcela běžné. Jedná se o mastné kyseliny s 36 uhlíky, jež se hlavně vyskytují ve značném množství pouze v mozku (*Valenzuela R., 2013; Bishop M., 2010*).

Spojení mezi atomy uhlíku mastných kyselin je uskutečněno kovalentními vazbami. Ty mohou být jednoduché, označované také jako nasycené vazby nebo dvojně tzv. nenasyčené vazby. Množství dvojných vazeb v jedné molekule může být od jedné do šesti. Na základě počtu těchto vazeb se MK rozdělují na nasycené mastné kyseliny (SAFA – Saturated Fatty Acid), které nemají žádnou dvojnou vazbu v molekule, dále pak na mononenasyčené MK (MUFA – Monounsaturated Fatty Acid), jež mají jednu dvojnou vazbu a polynenasycené MK (PUFA – Polyunsaturated Fatty Acid) s více dvojnými vazbami v molekule (*Valenzuela R., 2013*).

U nenasyčených mastných kyselin jsou dvojně vazby většinou v konfiguraci cis (Z), čili oba atomy vodíku se nacházejí na stejné straně dvojně vazby, tím pádem je umožněno ohýbání struktury molekuly. Ohnutí zvětšuje prostor, který je nezbytný pro sbalení MK do lipidové vrstvy, a díky tomu jsou tyto mastné kyseliny více fluidní. Pokud se nenasyčené mastné kyseliny vyskytují v konfiguraci trans (E) tzn., že oba vodíkové atomy jsou na opačné straně dvojně vazby, není možné následné ohýbání jejich struktury a fyzikální vlastnosti se ve větší míře podobají nasyceným mastným kyselinám. V přírodě se trans MK zpravidla nevyskytují, ale jsou obsaženy v naší stravě, jelikož vznikají při chemické hydrogenaci, která se používá pro převedení polynenasycených rostlinných olejů na ztužené margaríny (*Bishop M., 2010*).

MK se v organismu vyskytují převážně ve formě esterů s alkoholy a menší množství zůstává např. v krvi v neesterifikované formě, ty jsou pak označovány jako volné mastné kyseliny (VMK). Díky jejich amfipatické povaze je umožněn jejich přenos, neboť dochází k vazbě na bílkoviny a to zejména na albumin (*Koolman J., 2012*).

1.1.3.1 Syntéza mastných kyselin

Syntéza mastných kyselin se uskutečňuje v cytosolu buněk, jelikož se zde nacházejí potřebné enzymy: acetyl-CoA-karboxyláza a syntáza mastných kyselin. Výchozím substrátem pro syntézu MK je acetyl-CoA, který je dále ve dvou krocích na multienzymovém komplexu přeměněn za účasti acetyl-CoA-karboxylázy a ATP na malonyl-CoA. Iniciačním krokem celé syntézy je kondenzace malonyl-CoA s acetyl-CoA. Jako další probíhají redukce a dehydratace vznikajícího řetězce, jenž je prodlužován připojováním malonyl-CoA. Celý proces je ukončen, jakmile řetězec obsahuje 16 uhlíků, což tedy odpovídá kyselině palmitové. Dalšími úpravami

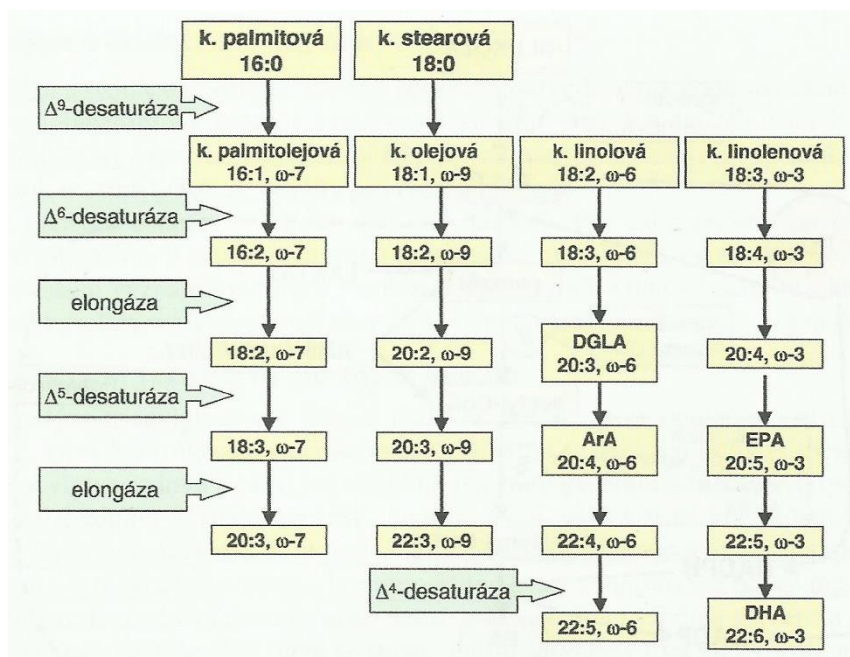
v endoplazmatickém retikulu za přítomnosti elongáz a desaturáz je tato kyselina přeměněna na vyšší nasycené a nenasycené mastné kyseliny (*Murray R., 2002*).

Elongázy se v buňce vyskytují na povrchu endoplazmatického retikula a zároveň v mitochondriích, avšak princip elongace je na každém místě různý. V endoplazmatickém retikulu probíhá prodlužování řetězce MK adicí malonyl-CoA k již stávajícímu řetězci, čili elongace probíhá podobně jako jejich syntéza. Naopak v mitochondriích jsou MK prodlužovány pomocí adice acetylové jednotky, která je následována dalšími redukcemi. V podstatě se jedná o obrácené reakce oxidace MK s rozdílem toho, že na saturaci dvojných vazeb se využívá NADPH místo FADH_2 (*Garrett R., 2010*).

Celý proces desaturace (viz Obrázek 1) probíhá za katalýzy specifických acyl-CoA-desaturáz. Tyto desaturázy se dělí na $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ - a $\Delta 9$ -desaturázy, což je dle polohy dvojně vazby na 4., 5., 6., a 9. uhlíku od karboxylového konce, jejíž tvorbu katalyzují. Člověk nemá enzymy $\Delta 12$ - a $\Delta 15$ -desaturázu, proto kyseliny, které tyto enzymy tvoří, jsou pro člověka esenciální. Jedná se o kyseliny, jež mají první dvojnou vazbu umístěnou na třetím (skupina n-3) nebo na šestém (skupina n-6) uhlíku od methylového konce řetězce mastné kyseliny. Jde tedy o kyselinu α -linolenovou a kyselinu linolovou (*Tvrzická E., 2011*).

Mononenasyčené mastné kyseliny jsou tvořeny za katalýzy $\Delta 9$ -desaturázy, kdy je do pozice $\Delta 9$ od methylového konce MK zavedena dvojná vazba. Pro tvorbu řady n-6 nenasycených mastných kyselin je prekurzorem kyselina linolová (LA, 18:2, n-6), která je působením $\Delta 6$ - a $\Delta 5$ -desaturáz měněna na kyseliny γ -linolenovou (GLA, 18:3, n-6), dihomo- γ -linolenovou (DGLA, 20:3, n-6) a arachidonovou (AA, 20:4, n-6). Kyselina arachidonová dále slouží pro syntézu eikosanoidů, jako jsou prostaglandiny, leukotrieny a prostacykliny, které mají prozánětlivé účinky.

Pro tvorbu nenasycených MK řady n-3 je výchozí látkou kyselina α -linolenová (ALA, 18:3, n-3), z ní pak dalšími reakcemi vznikají kyseliny eikosapentaenová (EPA, 20:5, n-3), dokosapentaenová (DPA, 22:5, n-3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6, n-3). Stejně jako v případě AA jsou EPA a DHA významnými prekurzory pro syntézu eikosanoidů, ale oproti AA mají protizánětlivé účinky, neboť z DHA jsou dále syntetizovány imunoregulační a protizánětlivé dokosanoidy: resolviny a protektiny (*Lee J., 2016; Tvrzická E., 2011*).



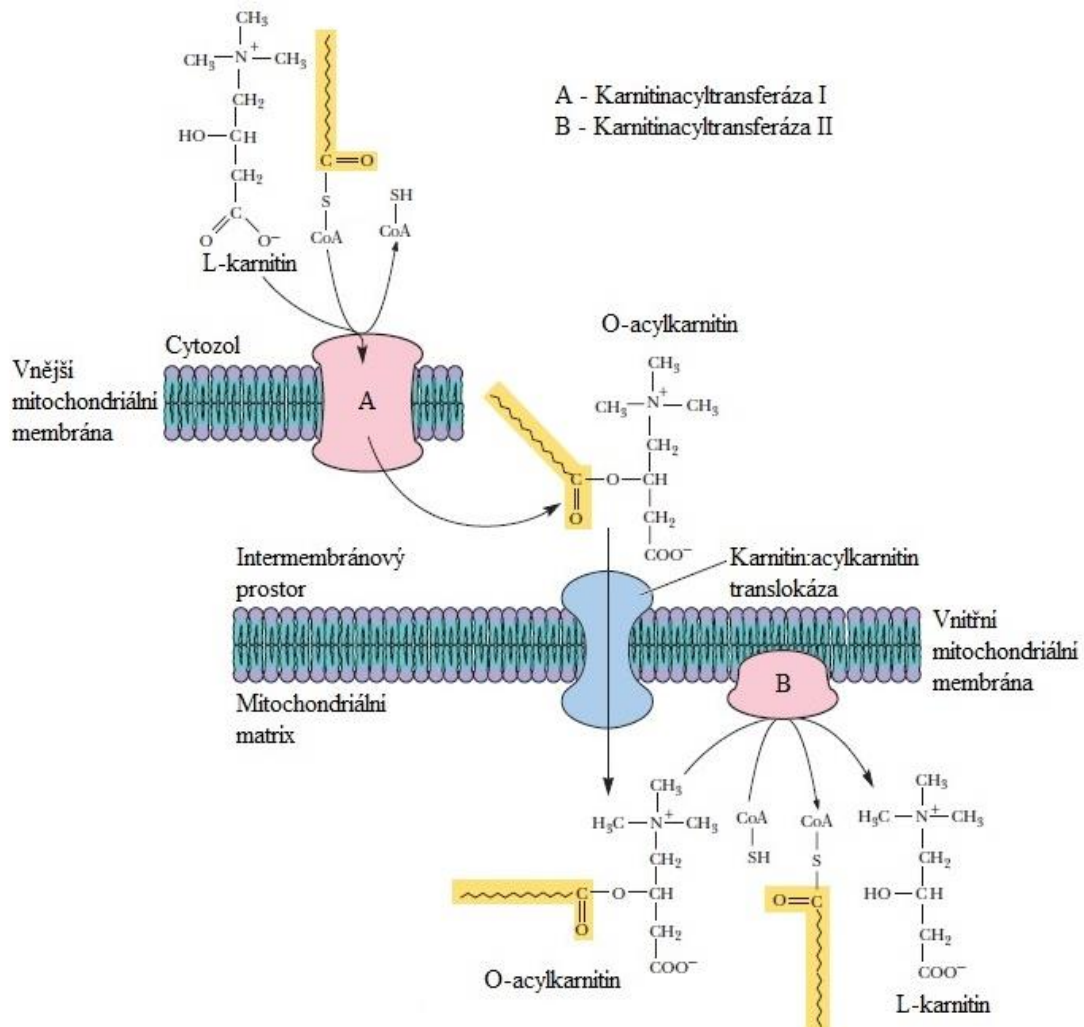
Obrázek 1 Znárodnění syntézy nasycených a nenasycených mastných kyselin (ArA – k. arachidonová), (Holeček M., 2006)

1.1.3.2 Odbourávání mastných kyselin

Přenos MK do buňky přes cytoplazmatickou membránu probíhá na základě prosté a facilitované difuze. Transport MK prostou difuzí se uskutečňuje díky rozdílu jejich koncentrací v extracelulárním a intracelulárním prostoru. Při facilitované difuzi jsou MK přenášeny přes membránu pomocí proteinových přenašečů, čili je zde určitá možnost regulace přenosu. Hlavní systémy pro facilitovanou difuzi jsou FATP-6 (Fatty acid Transport Protein) a FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase CD36). Tyto přenašeče se nacházejí ve svalech a jejich maximální kapacita pro přenos se zvyšuje účinkem inzulínu a při práci svalů (Holeček M., 2006).

Odbourávání mastných kyselin probíhá procesem oxidace, jehož hlavním pochodem je β -oxidace. Jedná se o oxidaci β -uhlíku MK a následující odštěpování dvouuhlíkových jednotek. Nejdříve dojde k aktivaci MK, jež probíhá v endoplazmatickém retikulu nebo na vnější mitochondriální membráně. Aktivaci MK je myšlena syntéza acyl-CoA z mastné kyseliny za účasti acyl-CoA-synthetázy, která je doprovázena současnou hydrolýzou ATP (Matouš B., 2010). Vlastní β -oxidace probíhá v matrix mitochondrií, z toho důvodu po vzniku acyl-CoA následuje série transportních reakcí. Tento transport je zprostředkován trojicí enzymů, které jsou umístěny na dvojité mitochondriální membráně, kdy na vnější membráně se nachází

karnitinacyltransferáza I a na vnitřní membráně je přítomna karnitin-acylkarnitin-translokáza společně s karnitinacyltransferázou II, viz Obrázek 2 (Campbell M., 2009).



Obrázek 2 Transport thioesteru acyl-CoA do mitochondrie (obrázek upraven podle Garrett R., 2010)

Vlastní β -oxidace je složena ze čtyř enzymaticky katalyzovaných reakcí. Degradace MK začíná dehydrogenací na β uhlíku acyl-CoA, která je následována hydratací za katalýzy enoyl-CoA hydratázy a druhou dehydrogenací, při níž vzniká β -ketoacyl-CoA a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Konečnou fází je uvolnění acetyl-CoA a o dva uhlíky kratšího acyl-CoA. Celý proces se opakuje až do úplného rozštěpení MK na acetyl-CoA. U MK, které mají lichý počet uhlíků, vzniká jako konečný produkt propionyl-CoA. Odbourávání nenasycených MK se navíc účastní enzymy, jež katalyzují izomeraci dvojných vazeb. Zvýšená aktivita β -oxidace, která se může vyskytnout

u diabetes mellitus nebo při hladovění je spojena se zvýšenou tvorbou ketonových látek až případnou ketoacidózou (*Campbell M., 2009*).

1.1.3.3 Nenasycené mastné kyseliny

Všeobecně platí, že se termínem esenciální mastné kyseliny (EFA) označují všechny nenasycené mastné kyseliny, které mají v molekule více než jednu dvojnou vazbu. Jedná se o LA, GLA, DGLA, AA, ALA, EPA, DHA a termín PUFA se používá pro: GLA, DGLA, AA, EPA, DHA. Oba tyto termíny se často zaměňují. Je to hlavně proto, že PUFA jsou považovány za funkční esenciální MK, čili mohou do jisté míry v těle nahradit chybějící EFA (*Das U., 2008*).

EFA jako živiny vytváří rozsáhlou řadu bioaktivní mediátorů, jež mají účinek na velkou skupinu selektivních receptorů. Jsou tak schopny ovlivňovat velkou řadu oblastí v lidské fyziologii, protože téměř na každé buňce a tkáni lidského těla se nachází alespoň jeden z těchto selektivních receptorů. Při deficitu mastných kyselin z řady n-3 společně s nadměrným působením mediátorů PUFA n-6 mohou vznikat problémy, jako jsou arytmie, ateroskléróza, trombóza, infarkt, rakovinné bujení, astma, imunitní zánětlivá porucha, deprese a duševní porucha (*Lands B., 2012*).

Pojmem esenciální jsou označovány látky, které náš organismus není schopný syntetizovat, čili je musíme přijímat potravou. Mezi významné zdroje EFA řady n-3 patří listy a semena některých rostlin, jde např. o lněné semínko a sóju. Dále se ve vysokých koncentracích vyskytují v tučných rybách, jakou je losos, makrela, čerství tuňák, sled' a pstruh. Hlavním zdrojem EFA n-6 je slunečnicový olej, v nižších koncentracích se pak nacházejí v oleji z vlašských ořechů, pšeničných klíčků a sezamových semínek (*Tvrzická E., 2011*).

1.1.4 Cholesterol

Cholesterol (CH) je nejznámějším a zároveň nejdůležitějším živočišným steroidem. U živočichů se vykytuje volně nebo ve formě esterů ve všech tkáních. Společně s fosfolipidy vytváří integrální část biologických membrán všech živočišných buněk. Jeho základem je steranové jádro, které má v poloze 3 hydroxyskupinu a v poloze 17 alifatický řetězec, kdy konformace těchto skupin působí na chování CH v buněčných membránách (*Matouš B., 2010*).

Cholesterol se do těla dostává s potravou nebo je v těle syntetizován. Jeho syntéza je jedna z nejsložitějších syntéz, která probíhá v cytosolu hepatocytů (*Řezáčová M., 2008*). Syntéza vychází z acetyl-CoA a zahrnuje více než 20 reakcí, jež se dělí do čtyř stupňů, a to na: tvorbu mevalonátu, vznik isopentyldifosfátu, vznik skvalenu a přeměnu skvalenu na cholesterol (*Koolman J., 2012*).

Ve většině případů buňky využívají CH pro modulaci svých membrán a nadbytek vyloučí ven z buňky třemi způsoby:

- HDL částicím,
- exkrecí do žluče nebo lumen střeva za pomoci transportérů,
- hydroxylací na oxysteroly, která zvyšuje rozpustnost CH (*Lubanda H., 2009*).

Člověk nemá enzymy, které by byly schopné štěpit alifatický řetězec CH, z toho důvodu je CH metabolizován na další důležité látky. V játrech se téměř tři čtvrtiny CH mění na žlučové kyseliny, v kůži z něj přes 7-dehydrocholesterol vzniká vitamín D a v kůře nadledvin a gonádách se nadbytečný CH přeměňuje na steroidní hormony (*Ledvina M., 2004*).

CH může existovat volně nebo jako ester cholesterolu (ECH), kdy je esterifikován jednou mastnou kyselinou. V krvi jsou přibližně dvě třetiny cholesterolu v esterifikované formě. ECH představují v organismu transportní a skladovací formu cholesterolu a tvoří podstatnou část jádra LDL (Low Density Lipoprotein) a HDL částic. Navíc jsou hlavní složkou lipidové inkluze makrofágů a pěnových buněk lokalizovaných v aterosklerotických lézích. Syntéza ECH probíhá u lidí intravaskulárně za katalýzy lecitin:cholesterol acyltransferázy (LCAT). Estery cholesterolu, které se nacházejí v lipoproteinových částicích, obsahují převážně kyselinu linolovou (zhruba 50 %), dále olejovou, palmitovou a arachidonovou kyselinu (*Tvrzická E., 2011; Hodson L., 2008*).

1.2 Pankreas

Pankreas neboli slinivka břišní je žláza, která se skládá z exokrinní a endokrinní tkáně. Endokrinní část pankreatu je tvořena specializovanými buňkami označovanými jako Langerhansovy ostrůvky a zaujímá 2-3 % hmoty žlázy. Mezi hlavní buňky těchto ostrůvků patří β -buňky, jež se vyznačují produkcí inzulínu, dále α -buňky, které produkují glukagon, a také se zde nachází δ -buňky, které produkují somatostatin

a PP-buňky tvořící pankreatický polypeptid. Exokrinní část se podílí na tvorbě trávicích enzymů, které při trávení potravy štěpí bílkoviny, tuky a cukry.

1.2.1 Inzulín

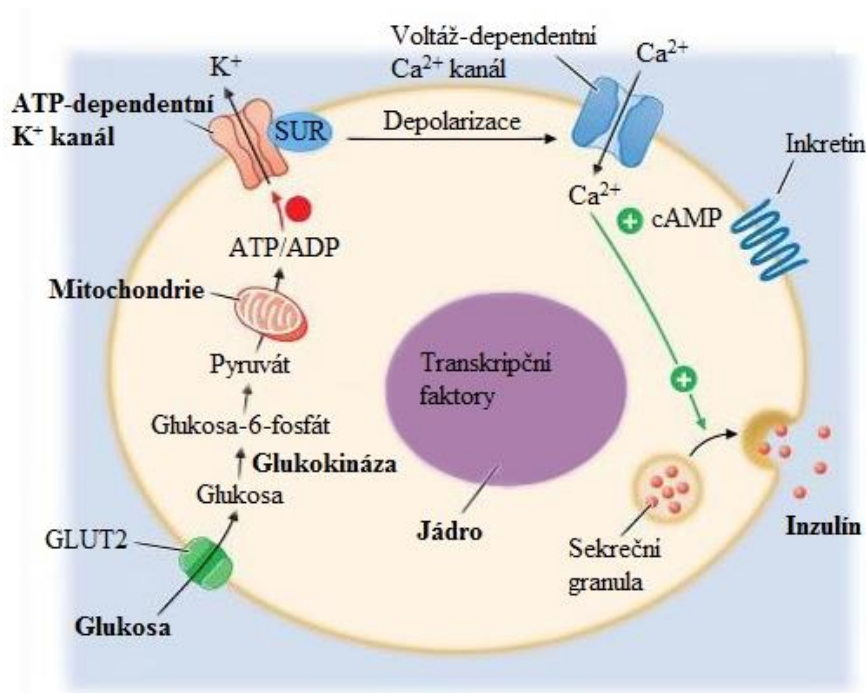
Lidský inzulín je proteohormon, který má anabolické účinky. Jeho hlavní funkce je ovšem zajištění vstupu glukosy z krevního řečiště do nitra buněk. Skládá se ze dvou polypeptidových řetězců (A, B), kdy řetězec A je složen z 21 aminokyselin a řetězec B obsahuje 30 aminokyselin. Jejich spojení zajišťují dva disulfidické můstky.

1.2.1.1 Biosyntéza a sekrece inzulínu

Biosyntéza inzulínu začíná v ribozomech β -buněk, kde se jako první tvoří preproinzulín, jenž je dále v endoplazmatickém retikulu štěpen účinkem proteáz na proinzulín. Proinzulín se skládá ze dvou polypeptidových řetězců A a B navzájem spojených přes C-peptid. Následně dochází v ekvimolárním poměru ke štěpení proinzulínu v Golgiho aparátu na C-peptid a inzulín. Vzniklý inzulín je po reakci s ionty zinku uložen do sekrečních granul společně s C-peptidem (*Pelikánová T. 2011*).

Vstup glukosy přes glukosový transportér GLUT 2 a její změna za účasti glukokinázy na pyruvát je hlavním podnětem pro iniciaci sekrece inzulínu (viz Obrázek 3). Touto přeměnou je zvýšen poměr ATP/ADP, tím jsou uzavřeny draselné kanály, což způsobí depolarizaci membrány a následné otevření vápenatých kanálů, čímž dojde k aktivaci exocytózy a uvolnění inzulínu z buňky. Podnět pro sekreci inzulínu je možné dále vyvolat účinkem například volných mastných kyselin nebo methyl-sukcinátu (*Ahmed N., 2011*).

Produkce inzulínu se denně pohybuje kolo 20-40 IU. Z toho je polovina uvolňována nezávisle na příjmu potravy, čili odpovídá tzv. bazální sekreci a druhá polovina je uvolňována po předchozí stimulaci při příjmu potravy, což je tzv. prandiální sekrece. Od příjmu potravy do 30 minut je v plazmě nejvyšší koncentrace inzulínu, pak dochází k pozvolnému návratu k bazálním hodnotám koncentrace (*Pelikánová T., 2011*).



Obrázek 3 Sekrece inzulínu (obrázek upraven podle Fauci A., 2008)

1.2.2 Účinky inzulínu

V periferní tkáni jsou účinky inzulínu na buňky zajištěny jeho vazbou na inzulínový receptor. Jakmile je inzulínový receptor aktivován dojde ke spuštění kaskády fosforylačně-defosforylačních reakcí, které mají za společný cíl aktivaci GLUT transportérů, syntézu a aktivaci enzymů, jež se účastní metabolických drah a změnu nukleárních transkripčních faktorů.

V játrech účinky inzulínu aktivují glykolýzu a syntézu glykogenu a současně inhibují glykogenolýzu a glukoneogenezi, čímž má hlavní roli při inhibici produkce glukosy. Dále se podílí na stimulaci syntézy mastných kyselin. Ty jsou dále využívány pro tvorbu triacylglycerolů a lipogenezi.

V tukové tkáni snižuje aktivitu hormon senzitivní lipázy (HSL), a zabraňuje tak hydrolýze TAG a následnému uvolňování MK. Naproti tomu zvyšuje lipogenezi, neboť aktivuje lipoproteinovou lipázu (LPL) a podporuje vychytávání glukosy a glykolýzu.

Co se týče metabolismu proteinů, tak účinek inzulínu stimuluje proteosyntézu a snižuje proteolýzu (Matouš B., 2010; Pelikánová T., 2011).

1.3 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je možné charakterizovat jako skupinu chronických, etiopatogeneticky heterogenních onemocnění, pro niž je společný znak hyperglykemie. Diabetes je zapříčiněn nedostatečným účinkem inzulínu případně poruchou jeho sekrece a dále je doprovázen deficitem metabolismu tuků, cukrů a bílkovin.

Porucha má největší projevy v metabolismu glukosy, což má za následek dlouhodobý vývoj cévních komplikací jako je urychlená ateroskleróza, neuropatie nebo retinopatie. DM může být klasifikován na základě poruch glukosové homeostázy na:

- Diabetes mellitus 1. typu,
- Diabetes mellitus 2. typu,
- Gestační diabetes mellitus,
- Ostatní typy (*Pelikánová T., 2011*).

DM se v současné době označuje jako jedno z nejrychleji rozvíjejících se onemocnění, jež postihuje po celém světě okolo 347 milionů lidí. Světová zdravotnická organizace dokonce předpovídá, že by se DM mohl stát do roku 2030 sedmou hlavní příčinou smrti člověka (*Drábková P., 2015*).

1.3.1 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu vzniká při nedostatku inzulínu, který je zapříčiněn destrukcí β -buněk slinivky břišní autoimunitní reakcí. Rozvoj probíhá u osob, které mají genetické predispozice, jež jsou podmíněny geny z HLA (Human Leukocyte Antigens), po setkání s faktory z vnějšího prostředí, což může být např. virová infekce. Jde tedy o autoimunitně podmíněný diabetes. Nicméně se může vyskytovat i tzv. idiopatický DM 1. typu, který nemá zatím objasněnou etiologii a neprojevuje známky autoimunity (*Pelikánová T., 2011; Seino Y., 2010*).

Při onemocnění dochází ke klinickým projevům až po destrukci 80 % β -buněk pankreatu, do té doby probíhá onemocnění skrytě několik týdnů, výjimečně až několik let. Základním projevem je zvýšená hladina glykemie. Při překročení hodnoty hladiny glykemie nad 10 mmol/l, což je hodnota označovaná jako ledvinný práh pro glukosu, dochází k projevům polyurie a glykosurie. Z tohoto byl odvozen také název diabetes mellitus neboli úplavice cukrová. Při sníženém obsahu inzulínu v plazmě buňky ztrácí schopnost využít glukosu, proto získávají energii z tuků a bílkovin. Následkem

je zvýšení lipolýzy, čímž se zvýší i obsah ketolátek a projevuje se ketoacidóza a ketonurie (*Bělobrádková J., 2006*).

1.3.2 Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu označuje skupinu onemocnění, které mají různou etiopatogenezi a klinické projevy. Vyznačuje se výrazným poklesem sekrece inzulínu nebo inzulínovou rezistencí na základě genetické predispozice spojené se špatným životním stylem, jako je stres, nedostatek pohybu, přejídání a špatné složení potravy vedoucí k obezitě. β -buňky si do jisté míry zachovávají svou funkci, to znamená, že nemocní nejsou závislí na užívání exogenního inzulínu a jejich léčba je na počátku onemocnění možná pouze dietou, pohybem, případně užíváním perorálních antidiabetik. DM 2. typu představuje 85 % z celkového počtu diabetiků a nejvíce vzniká po překročení 40. roku života (*Bělobrádková J., 2006; Seino Y., 2010*).

DM 2. typu je projevem metabolického syndromu. Nemocní mají současně další abnormality, jako hypertenzi, dyslipidemii, centrální obezitu, endoteliální dysfunkci a vyšší sklon ke tvorbě trombů, které mají za následek zvýšení kardiovaskulárního rizika (*Pelikánová T., 2011*).

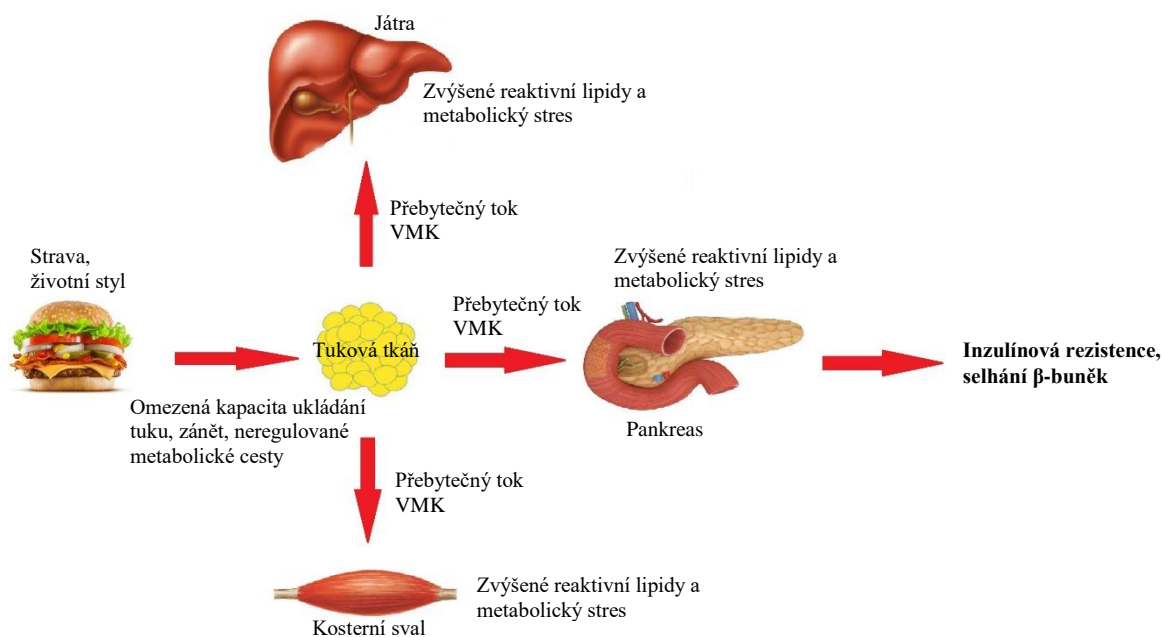
1.3.3 Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence (IR) je způsobena nedostačující odpovědí cílových tkání na účinky inzulínu, což je hlavně kvůli post receptorové poruše inzulínové signalizační kaskády. Následně je vykompenzována hyperinzulínémií, to vede k inhibici produkce jaterní glukosy, ale naproti tomu je stimulována utilizace glukosy v tukové tkáni a buňkách svalů. Jako první se inzulínová rezistence projevuje v tukové tkáni, dále pak postihuje kosterní svalstvo, játra, centrální nervový systém, cévní endotel a imunokompetentní buňky. Morfologicky se uvnitř buněk projevuje zvýšenou akumulací lipidů a sníženým obsahem mitochondrií (*Žák A., 2011; Delarue J., 2004*).

Inzulínová rezistence na molekulární úrovni má za následek poruchy v inzulínové signalizaci. Může se jednat o sníženou aktivitu fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI-3-K) inzulínových receptorů nebo sníženou post receptorovou fosforylaci. Při poškození aktivity PI-3-K dochází ke sníženému vstřebávání glukosy do buňky, jelikož PI-3-K se podílí na translokaci GLUT 4 na povrch buněk. Následky jsou stejné jak pro diabetes mellitus, tak pro obezitu a metabolický syndrom, kdy rozvoj IR u lidí s obezitou je

způsoben nadměrnou konzumací potravy, genetickou predispozicí pro DM a také v neposlední řadě působením vlivů vnějšího prostředí (Delarue J., 2004).

V tukové tkáni se IR projevuje ztrátou schopnosti inzulínu inhibovat lipolýzu, která je za fyziologického stavu a u zdravých jedinců regulována. Na regulaci lipolýzy se podílí řada enzymů, mezi které patří HSL, jež katalyzuje štěpení triacylglycerolů na mastné kyseliny a glyceroly (DAG), dále adipocytární triglyceridová lipáza (ATGL) a monoglyceridová lipáza. Aktivita HSL je inhibována inzulínem, což vede k potlačení lipolýzy a následnému uvolňování volných mastných kyselin (VMK). Naproti tomu při zvýšených koncentracích VMK dochází k aktivaci sympatoadrenálního systému, oxidačnímu stresu, endotelové dysfunkci a ukládání tuků mimo adipocyty do tkání. V nich vyvolá nadměrný obsah lipidů funkční a morfologické poškození (viz Obrázek 4). Celý tento mechanismus bývá označován jako lipotoxicita (Žák A., 2011; Pelikánová T., 2011).



Obrázek 4 Schématické znázornění lipotoxicity v souvislosti s metabolickým syndromem (obrázek upraven podle Orešič M., 2010)

1.3.4 Lipidový metabolismus při DM

Diabetes mellitus typu 2 a inzulínová rezistence jsou většinou spojeny se změnami plazmatických lipoproteinů. K těmto změnám patří především abnormalita v metabolismu VLDL (Very Low Density Lipoprotein), HDL a v nemalé míře i LDL frakce. Větší riziko vzniku aterosklerózy je způsobeno snížením obsahu HDL cholesterolu, dále pak zvýšenou sekrecí jaterních VLDL, které mají velký obsah TAG

a současně dochází k jejich sníženému odbourávání. Největším rizikovým faktorem pro vznik cévního onemocnění je zvýšená koncentrace malých denzních LDL částic (*Howard B., 1987; Kraus R., 2004*).

Z viscerální tukové tkáně, jež je rezistentní na účinky inzulínu, jsou ve zvýšené míře uvolňovány volné mastné kyseliny, které jsou následně zpracovány v játrech. Tato zvýšená nabídka MK játrům je pak využívána v různých směrech. Velká část je použita pro nadměrnou tvorbu TAG, jež následně slouží pro vznik VLDL částic. Ty pak v oběhu mohou interagovat s HDL částicemi, které z nich za účasti cholesterol-ester-transfer-proteinu (CETP) přijímají TAG, čímž dochází ke změně velikosti částic. Tak vznikají malé HDL částice, jež jsou odstraněny v ledvinách a velké částice VLDL. Ty štěpí v oběhu lipoproteinová lipáza na LDL částice, které mají velký obsah TAG. Tyto vzniklé částice jsou hydrolyzovány jaterní lipázou nebo lipoproteinovou lipázou, čímž dále vznikají malé denzní částice LDL, jež převažují u diabetiků a jejich aterogenní potenciál je výrazně vyšší než u fyziologických LDL částic (*Dresslerová I., 2013; Rybka J., 2007*).

Správná funkce LDL závisí i na hladině glukosy v krvi, neboť při déle trávající hyperglykémii může dojít ke glykaci proteinů v LDL. Vzniklé změny v konformaci apoproteinu snižují afinitu LDL částic k receptoru, čímž je prodloužena jejich eliminace, a proto můžou snadněji podléhat oxidativní modifikaci. Glykované částice navíc vykazují větší afinitu k proteoglykanům cévní stěny, čímž se zvyšuje jejich podíl na vzniku aterosklerotického plátu (*Rybka J., 2007; Kraus R., 2004*).

Aktivita LPL je ve tkáních nižší, což má za následek snížené zpracování MK, ale naproti tomu koncentrace extracelulárních mastných kyselin se zvyšuje. Ty mohou pronikat do buněk na základě prosté difuze a ve vysokých koncentracích snižují v mitochondriích aktivitu některých enzymů citrátového cyklu. Acetyl-CoA vzniklý při β -oxidaci je využíván pro syntézu ketolátek a cholesterolu. Velká část ketolátek je vyloučena močí a část acetonu, jež vzniká při ketoacidóze, je eliminována plícemi. Navíc zvýšená tvorba NADH podporuje produkci glycerol-3-fosfátu, jenž je využit při syntéze TAG (*Holeček M., 2006*).

HDL má několik frakcí, z nichž antiaterogenní účinek má především frakce HDL2b, jež je zodpovědná za transport volného cholesterolu z buněk do jater. Naopak frakce HDL3b a 3c mají lépe uzpůsobený povrch pro esterifikaci cholesterolu, jenž poté CETP vrací zpět do aterogenních částic VLDL a LDL. U diabetiků je hladina HDL snížena hlavně kvůli zvýšené výměně esterů cholesterolu za TAG, neboť mají zvýšenou

aktivitu CETP, která tuto výměnu zprostředkovává. Tím se cholesterol vrací zpět do aterogenních částic LDL a VLDL. Navíc obohacené HDL o TAG jsou rychleji degradovány za účasti jaterní lipázy a mění se tak poměr jednotlivých subfrakcí tzn., že třída HDL2 klesá a současně se zvyšuje počet malých HDL3 frakcí (*Pelikánová T., 2011*).

1.3.5 Vliv nenasycených a nasycených mastných kyselin

Volné mastné kyseliny mají v mnoha buněčných procesech uplatnění jako signální molekuly, včetně sekrece inzulínu. Experimenty bylo prokázáno, že dlouhodobě zvýšená koncentrace nasycených mastných kyselin má lipotoxické účinky na β -buňky pankreatu. SAFA také inhibují syntézu proinzulínu a snižují sekreci inzulínu, kterou stimuluje glukosa. Díky tomuto zvýšené hladiny SAFA způsobují změny ve správném fungování β -buněk slinivky břišní, čímž je zvýšen poměr proinzulínu/inzulínu, který se využívá jako ukazatel dysfunkce β -buněk pankreatu (*Lupi R., 2002*).

N-6 nenasycené mastné kyseliny s více vazbami svými metabolickými účinky zvyšují tvorbu cholesterolu a aktivitu LDL receptorů, neboť je zvýšena aktivita cholesterol-7 α -hydroxylázy a snížena přeměna VLDL na LDL. Při zvýšených koncentracích PUFA n-6 dochází ke snížení celkového HDL a LDL cholesterolu a ke vzrůstu oxidability částic LDL. Po aktivaci peroxizomovými proliferátory působí PUFA n-6 jako ligandy receptorů, čímž zvyšují inzulínovou senzitivitu a změny tak distribuci tuku v těle a velikost adipocytů (*Žák A., 2011*).

Výzkumy byly potvrzeny pozitivní účinky PUFA n-3 na metabolismus glukosy a lipidů. Svými účinky snižují hladiny triacylglycerolů, zvyšují koncentrace HDL cholesterolu v plazmě, dále mohou redukovat krevní tlak a vylepšovat inzulínovou senzitivitu. Při užívání PUFA n-3 jako doplněk potravy při autoimunitních a zánětlivých onemocněních jsou pozorovány protizánětlivé účinky těchto kyselin. PUFA n-3 svým působením snižují produkci prozánětlivých eikosanoidů, cytokinů a stimulují expresi adhezivních molekul. (*Takahashi M., 2017; Wang Y., 2015*).

Pro určení rozvíjející se zánětlivé odpovědi je mnohem důležitější při příjmu potravy poměr n-3 a n-6 EFA, než absolutní poměr kyselin řady n-3. Pokud je zvýšen příjem potravy EFA n-6, dochází k inhibici začlenění eikosapentaenové kyseliny do membrány neutrofilů a snížení inhibice tvorby zánětlivých mediátorů. Naopak při nárůstu konzumace kyselin z řady n-3 dochází k významnému potlačení konverze kyseliny arachidonové na prozánětlivé eikosanoidy (např. tromboxan A2), jež jsou

za přítomnosti 5-lipoxygenázy tvořeny v neutrofilech., monocytech a makrofázích (Wang Y., 2015).

Obsah PUFA v biologických membránách ve velké míře ovlivňuje jejich permeabilitu, deformabilitu a fluiditu. Polynenasycené mastné kyseliny n-3 také mění charakter specifických proteinů např. ATPázy a proteinkinázy C. Dále vykazují antiarytmické působení, pozitivní ovlivnění imunitní reakce a užívání zvýšených dávek nad 3g/den kyseliny eikosapentaenové a dokosahexaenové vede ke zlepšení vlastností cévních stěn a snížení agregace krevních destiček. Navíc je do určité míry prokázán preventivní účinek při podávání PUFA n-3 na vznik atopického ekzému, astmatu a u kojenců v průběhu revmatoidní artritidy pozitivně působí na zánětlivou aktivitu (Žák A. 2011).

Z výše uvedených účinků polynenasycených mastných kyselin řady n-3 vyplývá jejich příznivé působení u diabetiků typu 2, kteří trpí dyslipidemií s charakteristickou hypertriacylglycerolémií, prokoagulačním stavem a sníženou koncentrací HDL v plazmě a zvýšeným obsahem denzních LDL částic. Sirtori (1998) a Kessavelu (2002) popsali kladné ovlivnění diabetické dyslipidémie pomocí léčby PUFA n-3. Jejich denní užívání v dávkách od 1,8 do 3 g vedlo k výraznému snížení hypertriacylglycerolémie, zvýšení hladiny HDL a slabému zvýšení LDL, které je ale možné odstranit podáváním statinu. Z další rozsáhlé studie z roku 2008 s názvem AFORRD (The Atrovastatin in Factorial with Omega-3 Fatty Acid to Risk ReDuction trial) vyplývá, že užívání PUFA řady n-3 má na kompenzaci diabetu pouze neutrální vliv (Žák A., 2011). Navíc příjem PUFA n-3 vykazuje protektivní účinky před kardiovaskulárním onemocněním, ale jeho účinky na riziko diabetu 2. typu jsou rozlišné mezi různými populacemi (Zheng J., 2012). U pacientů s dlouhodobým, dobře kontrolovaným DM typu 2 a aterosklerotickým onemocněním léčba vysokými dávkami PUFA n-3 (1 g/den EPA a 1 g/den DHA po dobu 3 měsíců) nezlepšuje koagulační, metabolický a zánětlivý stav. Pro lepší objasnění role n-3 PUFA v regulaci komplexních procesů je zapotřebí dalších studií (Poreba M., 2017).

Možné vedlejší účinky při užívání PUFA jako je břišní dyskomfort, průjem, říhání a dech páchnoucí po rybách, jsou téměř minimální. Projevují se hlavně při užívání vyšších dávek PUFA a jsou odstraňovány podáváním enterosolventních potažených kapslí (Žák A., 2011).

1.4 Chromatografie

1.4.1 Princip chromatografie

Chromatografie je řazena mezi separační techniky, při níž se separují složky vzorku mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, z nichž jedna je fáze stacionární (nepohyblivá) a druhá fáze je mobilní (pohyblivá). Vzorek se většinou dávkuje na počátek stacionární fáze a je soustavou unášen díky pohybu mobilní fáze. Jednotlivé složky vzorku se vážou různou silou na stacionární fázi, čím silnější je tato vazba, tím déle se zdržují v koloně. Na základě tohoto jsou od sebe jednotlivé molekuly separovány a následně probíhá jejich detekce na výstupu z kolony (Klouda P., 2003).

1.4.2 Rozdělení chromatografických metod

Z důvodu velkého množství chromatografických metod jsou rozdělovány do několika určitých skupin podle několika hledisek (viz Tabulka 1 a Tabulka 2).

Tabulka 1 Rozdělení chromatografických metod

Podle skupenství mobilní fáze	Kapalinová chromatografie	Mobilní fáze je kapalina
	Plynová chromatografie	Mobilní fáze je plyn
	Kolonová chromatografie	-
Podle uspořádání stacionární fáze	Plošné techniky	Papírová chromatografie
		Tenkovrstvá chromatografie

Při separaci bývá uplatňováno hned několik fyzikálně-chemických dějů současně, z nichž jeden vždy převládá. Na základě tohoto můžeme chromatografické metody rozdělit na: viz Tabulka 2.

Tabulka 2 Rozdělení chromatografických metod dle povahy děje při separaci

Podle děje uplatňujícího se při separaci	Rozdělovací chromatografie	Rozhoduje odlišná rozpustnost vzorku ve stacionární a mobilní fázi
	Adsorpční chromatografie	Rozhoduje různá schopnost složek adsorbovat se na povrch stacionární fáze
	Iontově-výměnná chromatografie	Rozhodují různě silné elektrostatické přitažlivé síly
	Gelová chromatografie	Rozhoduje velikost pórů stacionární fáze (gelu) tzv. molekulově síťový efekt
	Afinitní chromatografie	Rozhoduje afinita (úzce selektivní vztah) určité složky vzorku ke stacionární fázi

(Klouda P., 2003)

1.4.3 Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě (Thin-layer chromatography – TLC) může být definována jako diferenciální migrační proces, kde složky vzorku jsou zadržovány v různé míře v tenké vrstvě sorbentu (stacionární fázi) a spolu s rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel (mobilní fáze) se pohybují kapilárním působením přes vrstvu sorbentu. Zadržení analytů pak závisí na interakcích, ke kterým dochází v kapalně fázi, na povrchu nebo v porézní fyzikální struktuře nebo může existovat přímá interakce s molekulární strukturou sorbentu. Dále je retence ovlivňována povahou rozpouštědla a v něm obsažených přísad. Při dělení složek se uplatňuje řada interakcí, jako jsou elektrostatické síly, výměna iontů, vodíkové vazby, van der Waalovi síly a další.

Základem TLC je použití tenké sorbentní vrstvy silné 0,10 až 0,25 mm, která je nanosená na pevnou podložku ze skla, hliníku nebo plastu. Jako sorbent se používá silikagel, celulóza, oxid hlinitý, polyamid a chemicky spojované silikagely, jehož volba závisí na typu dělených složek (Wall P., 2005).

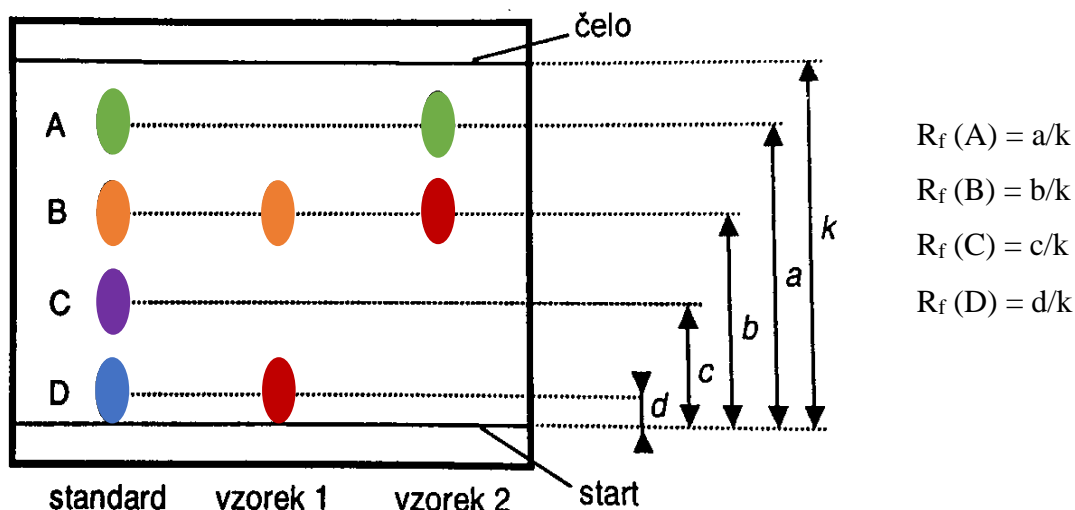
Pro separaci lipidů se jako stacionární fáze nejvíce používá silikagel, oxid hlinitý a křemelina, přičemž silikagel je jednoznačně dominantní fází. Oxid hlinitý může být dodatečně modifikován impregnací jinými látkami, aby se dosáhlo optimálního

výsledku separace určité třídy lipidů. Na základě povrchových charakteristik lze tyto fáze klasifikovat jako „normální“ nebo „obrácené“ fáze. Mezi různými modifikacemi stacionární fáze jsou nejoblíbenější impregnace dusičnanem stříbrným a kyselinou boritou. AgNO_3 se primárně používá k oddělení lipidů s různými mastnými acylovými složkami s různým stupněm nenasycenosti. Stříbrné ionty totiž tvoří komplex s π elektrony dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin, který vede ke snížení mobility těchto mastných kyselin. Ve vybraných případech je možné tímto stanovením určit i polohu dvojných vazeb. Naproti tomu kyselina boritá je užitečná pro detekci různých izomerů diacylglycerolů a pro separaci izomerních fosfolipidů, neboť tvoří komplexy se sloučeninami obsahující vicinální hydroxylové skupiny, což vede k pomalejší migraci těchto sloučenin (*Fuchs B., 2011*).

Vzorek je před aplikací na TLC desku rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle a nanesen jako skvrna nebo pás po jedné straně vrstvy sorbentu přibližně 2 cm od okraje. Separace probíhá v chromatografické komoře nebo častěji ve skleněné obdélníkové nádrži (vaně) s víkem, v níž je mobilní fáze tzv. eluent. Deska se po aplikaci vzorků umístí do chromatografické komory, která je nasycena parami mobilní fáze a eluent se nechá proudit kapilárním účinkem skrz sorbent v místě těsně pod aplikovanými vzorky. Jak fronta eluentu migruje přes sorbent, unáší s sebou také komponenty vzorku, ale při různých rychlostech, což vede k jejich následnému rozdělení. Jakmile fronta rozpouštědla dosáhne horní části sorbentu tzv. čela, je deska vyjmuta z komory a nechá se vysušit. V případě potřeby je možné separované skvrny vizualizovat pod UV zářením, chemickým zpracováním nebo derivatizací (*Wall P., 2005*).

Pro vizualizaci rozdělených lipidových frakcí se využívá toho, že mohou být snadno viditelné díky jejich vazbě na barvivo. K dispozici je řada různých činidel, jež se dělí podle jejich specifčnosti, a zda jsou destruktivní nebo nedestruktivní. Z nedestruktivních činidel se nejvíce používá 2,7-dichlorfluorescein, který poskytuje žluté skvrny po osvětlení UV světlem nebo rodamin, který vytváří ve vazbě na jednotlivé frakce růžové skvrny. Rodamin je vhodný pokud se používají alkalické mobilní fáze a naopak 2,7-dichlorfluorescein u kyselé mobilní fáze. Z destruktivních činidel je hojně využíván roztok 50% kyseliny sírové v metanolu (*Fuchs B., 2011*).

Umístění skvrny látky v tenkovrstvém chromatogramu lze popsat pomocí tzv. retardačního faktoru R_f . Ten je definován jako podíl vzdálenosti středu skvrny od startu (a) a čela od startu (k) viz Obrázek 5.



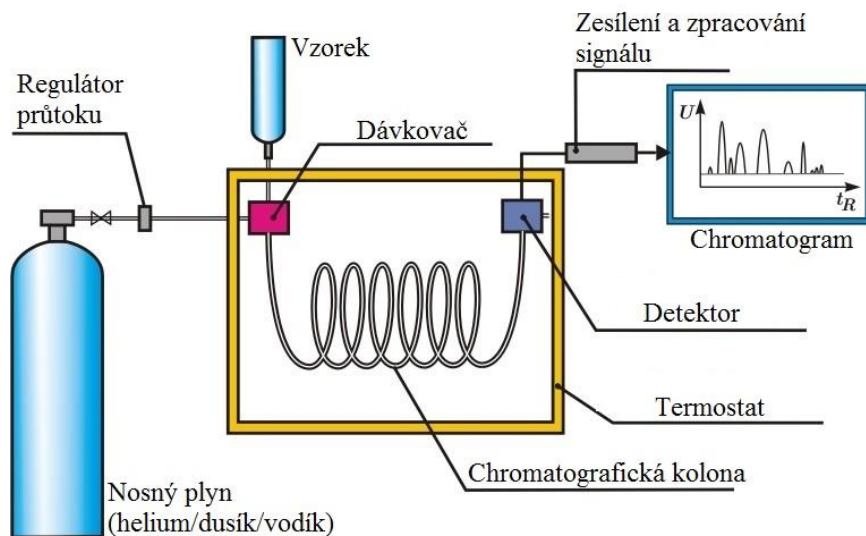
Obrázek 5 Výpočet retardačního faktoru (obrázek upraven podle Klouda P., 2003)

Vyhodnocení látek v TLC se provádí na základě hodnot R_f a jejich shody se standardem. Co se týče kvantitativního vyhodnocení, tak je buď přímé, nebo nepřímé. Přímá vyhodnocení se provádějí na tenké vrstvě a řadíme zde měření plochy skvrny, kdy logaritmus plochy skvrny je přímo úměrný koncentraci, dále radiochemické metody a denzitometrii. Denzitometr hodnotí stupeň ztmavnutí sorbentu v místě skvrny a platí, že čím je skvrna tmavší, tím více obsahuje analyzované složky. U nepřímé kvantitativní metody se nejprve skvrna z tenké vrstvy vyškrábe, následně se extrahuje a výsledná koncentrace látky je pak určena vhodnou instrumentální metodou (*Hahn-Deinstrop E., 2007*).

1.4.4 Plynová chromatografie

U plynové chromatografie (GC) se jako mobilní fáze používá nosný plyn a stacionární fází bývá kapalina zakotvená na inertním nosiči nebo většinou pevná látka. Separace probíhá na základě rozdělení plynných vzorků mezi dvě fáze. Aby mohl být vzorek unášen nosným plynem kolonou, musí být před dávkováním již v plynném stavu nebo se na plynnou fázi převádí zahřátím (*Klouda P., 2003*).

Plynový chromatograf (viz Obrázek 6) se skládá z několika různých částí, jsou to: tlaková láhev jako zásobník plynné fáze, zařízení, které reguluje tlak/průtok plynné fáze, dávkovací zařízení, chromatografická kolona, termostat, detektor a zařízení na zpracování signálu a jeho další vyhodnocení (Higson S., 2004).



Obrázek 6 Schéma plynového chromatografu (obrázek upraven podle Wikibooks)

V GC se jako nosné plyny používají velmi čisté inertní plyny, jako je N_2 , CO_2 , He nebo Ar, avšak volba plynu také závisí na typu detektoru, jenž bude v dané analýze používán. Zároveň čím má použitý plyn vyšší hustotu, tím pomalejší, ale účinnější separace bude, zatímco plyny s nízkou hustotou poskytují rychlejší separace (Grob R., 2004).

Chromatografická kolona v GC může být náplňová, kdy je na inertní pevné fázi adsorbována kapalina. Pevnou fází může být například oxid křemičitý, který poskytuje velkou plochu pro adsorpci kapaliny. Některé nosiče jsou navíc předem ošetřeny nebo deaktivovány (např. silanizací), aby se zabránilo adsorpci polárních analytů. Kapalná fáze musí být chemicky inertní, tepelně stabilní a teplotu varu musí mít alespoň o $100\text{ }^\circ\text{C}$ vyšší než maximální provozní teplota kolony. Další variantou je kapilární kolona, jež je vyrobena ze skla nebo taveného oxidu křemičitého s vnitřním průměrem od 0,25 do 0,5 mm a délky až 150 m. Vnější strana je potažena vrstvou polymerů. Tím vzniká silná a pružná kolona, která je navíjena tak, aby bylo možné její umístění do termostatické trouby (Higson S., 2004). Tato kolona má oproti náplňové koloně řadu výhod, které zahrnují výrazně lepší separaci s vyšším rozlišením, zkrácenou dobou analýzy, menší požadavky na velikost vzorku a často vyšší citlivost (Grob R., 2004).

Volba stacionární fáze závisí ve velké míře na povaze analyzovaného vzorku. Nicméně v GC převažují dva nejoblíbenější typy stacionárních fází a to polysiloxany a polyethylenglykolové fáze. Oba typy fází mohou být charakterizovány tak, že mají potřebnou viskozitu a schopnost zesíťení nebo chemické vazby na tavený oxid křemičitý. Polysiloxany nabízejí vysokou difuzivitu rozpuštěných látek spolu s vynikajícími stabilními tepelnými a chemickými vlastnostmi. Zároveň díky možnosti začlenění různé funkční skupiny (např. methyl, fenylyl, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$) do jejich struktury vykazují širokou škálu polarit. Polyethylenglykoly jsou nejčastěji používané stacionární fáze bez silikonu. Vykazují jedinečnou selektivitu a vysokou polaritu podobně jako kapalná fáze. Avšak jejich omezení je poměrně nízká horní mezní teplota okolo 225 °C a minimální provozní teplota 60 °C. Kromě toho stopové hladiny kyslíku a vody mají nepříznivé účinky na fázi, neboť urychlují její degradační proces (*Grob R., 2004*).

Detektory v plynové chromatografii monitorují a umožňují kvantifikaci analytů, které se postupně eluují z kolony. V ideálním případě by měly být detektory schopny reagovat na jakoukoliv jinou sloučeninu než je nosný plyn a reakce by se měla lineárně zvyšovat s rostoucí koncentrací analytu, a to v co největším rozsahu koncentrace (*Higson S., 2004*). Vzniklá signální odezva je charakteristická pro fyzikální nebo chemickou vlastnost sledovaného analytu. Pro plynovou chromatografii existuje celá řada detekčních systémů (viz Tabulka 3) a je třeba vždy zvolit vhodný systém pro konkrétní aplikaci.

Tabulka 3 Přehled typických detektorů pro GC

Detektor	Selektivita	Limit detekce	Lineární rozsah
Tepelně-vodivostní	Univerzální	1 ng/ml	10 ⁵
Plamenový ionizační	Organické sloučeniny	1 pg C/sloučeninu	10 ⁷
Elektronového záchytu	Elektron-zachycující sloučeniny jako halogeny	10 fg/sloučeninu	10 ⁴
Termoionizační	Sloučeniny s dusíkem a fosforem	1 pg N/sloučeninu 0,5 pg P/sloučeninu	10 ⁴
Fotoionizační	Aromatické látky	5 pg C/sloučeninu	10 ⁷

Detektor	Selektivita	Limit detekce	Lineární rozsah
Elektrolyticky- vodivostní	Halogeny a síra	1 pg Cl/sloučeninu	10 ⁶
		5 pg S/sloučeninu	10 ⁴
Atomový emisní	Jednotlivé prvky	0,1 – 50 pg/sloučeninu	10 ⁴

(Grob R., 2004)

Plamenový ionizační detektor (FID) – jedná se o nejoblíbenější destruktivní detektor v GC. Detekce je založena na spálení organických složek v kyslíkovodíkovém plamenu. V tomto spalovacím procesu se vytváří ionty, které jsou přitahovány k nabitě kolektorové elektrodě. Tímto indukovaným proudem iontů je generován proud, který lze měřit. Množství generovaného proudu je pak přímo úměrné koncentraci sloučenin zavedených do plamene. FID nejlépe reaguje na sloučeniny, jež obsahují vazbu uhlík-vodík.

Tepelně vodivostní detektor (TCD) – skládá se ze dvou cel, z nichž jedna slouží jako referenční a druhá jako měrná. V každé této cele je vlákno žhavené stálým elektrickým proudem. Při průchodu nosného plynu obsahující rozseparované látky měrnou celou, dochází ke změně teploty vlákna. Naproti tomu vlákno v referenční cele má teplotu konstantní. Ve výsledku je tedy měřen teplotní rozdíl mezi těmito vlákny, který je převeden na výstupní proud, jenž je zaznamenáván.

Detektor elektronového záhytu (ECD) – nosný plyn, převážně dusík obsahující analyzované látky, se přivádí do vyhřívané komory, ve které je umístěn radioaktivní zářič Ni, jenž zde slouží jako zdroj pomalých elektronů. Tyto elektrony jsou zachycovány elektronegativními atomy analyzovaných složek, a tím je snižován ionizační proud, který se měří a je transformován na výstupní signál. Tento typ detektoru je zvláště vhodný pro sloučeniny obsahující halogeny, karbonylovou skupinu nebo dusičnany.

Termoionizační detektor (NPD) – detektor obsahuje perličku alkalického kovu, zpravidla síran rubidia. Ionty tohoto kovu se teplem kyslíkovodíkového plamene dostávají do plynné fáze, kde ochotně reagují s heteroatomy organických látek, zejména s atomy dusíku a fosforu. Vzniklé ionty se přesouvají do nabitě kolektoru, kdy tímto

pohybem je indukován proud, který se měří a převádí se na výstupní signál (Cazes J., 2003).

1.4.5 Chromatografické metody pro stanovení mastných kyselin

Pro stanovení mastných kyselin ze séra jsou nejvíce používanými separačními technikami plynová chromatografie a vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Použití plynové chromatografie je velmi účinné a pro její provedení jsou potřebné pouze malé objemy látek, nicméně je potřebná derivatizace, jež může vést ke vzniku potíží z hlediska celkové reprodukovatelnosti. Při stanovení MK kapalinovou chromatografií je zapotřebí větších objemů rozpouštědla, ale derivatizace není nutná, naproti tomu ale separace nemá takovou účinnost. Navíc s kombinací s UV-VIS detektorem se mohou objevit problémy, neboť MK v tomto spektrální rozsahu mají malou absorpci. Z toho důvodu se u HPLC jako detektor nejvíce používá tandemový hmotnostní spektrometr (Tiuca I., 2015). V plynové chromatografii se nejvíce využívá plamenový ionizační detektor, jelikož má relativně nízké pořizovací náklady, je široce dostupný a také je to díky jeho jednoduchosti a poměrně vysoké citlivosti (Mannion D., 2016).

Plynová chromatografie neumožňuje přímé určení jednotlivých mastných kyselin z daných lipidových tříd (fosfolipidy, diacylglyceroly, triacylglyceroly a estery cholesterolu). Proto se provádí před samotnou GC separace jednotlivých tříd lipidů sloupcovou chromatografií nebo chromatografií na tenké vrstvě (Estévez S., 2005).

Plynovou chromatografií jsou mastné kyseliny analyzovány hlavně jako methylestery mastných kyselin (FAME), aby se tak zabránilo potenciální vodíkové vazbě mezi karboxylovou skupinou MK a taveným oxidem křemičitým kolony. Navíc jsou FAME tékavější sloučeniny než samotné MK a snadněji se oddělují na základě jejich teploty varu, čímž je umožněna jejich spolehlivá identifikace podle chemické struktury. Esterifikace volných mastných kyselin a transesterifikace esterifikovaných lipidů většinou probíhá v jednostupňové reakci za přítomnosti kyselých katalyzátorů (pro volné MK a esterifikované lipidy) nebo bazických katalyzátorů (pouze pro esterifikované lipidy) a v nadbytku metanolové fáze. Volba methylační metody je závislá na lipidových třídách přítomných ve vzorku a na povaze MK, tj. délce řetězce, konfiguraci dvojně vazby a stupni nenasycenosti (Sehl A., 2018).

Analýza FAME vyžaduje vysoké chromatografické rozlišování, zejména pro stanovení polohových a geometrických izomerů nenasycených mastných kyselin

v komplexních směsích. Pro splnění těchto požadavků se obvykle používají polární stacionární fáze, jelikož umožňují rozdělení podle nenasycenosti a počtu uhlíkových atomů (*Ruiz-Rodriguez A., 2010*).

Velkým problémem u analýzy n-3 PUFA je, že PUFA jsou spíše nestabilní, z toho důvodu nemůže být provedena kalibrace pomocí kvantitativních standardů. Proto se využívá buď korekčních faktorů, nebo se dává přednost empirickým reakčním faktorům, případně je možné využít teoretické faktory odezvy. Z toho plyne i velký důraz na volbu vhodného interního standardu (IS), který zlepšuje jak přesnost, tak správnost analýzy PUFA. Pro analýzu například mořských olejů se využívá jako interní standard C23:0 nebo pro analýzu methylesterů nenasycených MK (C22) je vhodné použít jako IS kyselinu heneikosanovou C21:0 (*Schreiner M., 2005*).

Pro stanovení poměru koncentrace kyseliny eikosapentaenové a kyseliny arachidonové byla vyvinuta metoda kapalinové chromatografie/elektrosprej ionizačně-tandemové hmotnostní spektrometrie (LC/ESI-MS/MS). Touto metodou jsou analyzovány sliny, místo běžně analyzovaného séra či plazmy. Na rozdíl od séra je jejich výhodou neinvazivní a jednoduchý odběr a podobně jako v plazmě může poměr EPA/AA ukazovat na možný vznik kardiovaskulární choroby. Detekce stop těchto dvou kyselin v lidských slinách touto metodou je umožněno použitím derivatizačního činidla 1-[(4-dimethylaminofenyl)karbonyl]piperazinu (DAPPZ), neboť použitím tohoto činidla je zvýšena senzitivita ESI (*Ogawa S., 2016*).

2 Experimentální část

2.1 Popis vzorků a jejich rozdělení

K analýze bylo zpracováno 15 vzorků od pacientů s diagnostikovaným diabetes mellitus 2. typu a 17 vzorků dobrovolných dárců nediabetiků odebraných v nemocnici v Tübingenu.

Centrifugací všech vzorků plné krve byla získána plazma, která byla odebrána do zkumavek Eppendorf a poté byla uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, do doby než došlo k analýze.

Pro dané vzorky byly také stanoveny koncentrace glykovaného hemoglobinu, podle kterých byly rozděleny do dvou skupin a to na Kontrolní skupinu a Diabetiky 2. typu (viz Tabulka 4)

Tabulka 4 Rozdělení vzorků podle hladiny glykovaného hemoglobinu

Skupina	Glykovaný hemoglobin [%]
Kontrolní skupina	4,5 – 5,8
Diabetici 2. typu	5,9 – 13,5

S použitím chromatografie na tenké vrstvě byly vzorky rozděleny na 5 frakcí (PL, DAG, VMK, TAG, ECH) a po jejich následné derivatizaci na methylestery mastných kyselin následovalo stanovení obsahu jednotlivých kyselin plynovou chromatografií.

2.2 Přístrojové vybavení a pomůcky pro TLC a GC

- Automatické pipety – 100, 200, 500 a 1000 μl
- Skleněné pipety – 5 a 10 ml
- Odměrné válce – 50 a 100 ml
- Mikrozkmavky Eppendorf
- Magnetická míchadla
- Pasteurovy pipety
- Chromatografická vana

- Chromatografické vialky s pryžovým septem
 - Typ: 5188-6599
 - Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Pyrexové zkumavky
 - Typ: 1636/26MP, 761152 Culture Tube 16x100 SVL SCORE
 - Výrobce: Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Spojené království
- Insety do chromatografických vialek
 - Typ: 8010-0132
 - Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Centrifuga typ MPW-340
 - Výrobce: Mechanika Precyzyjna, Polsko
 - Distributor: Servis Unimed, Vestec 41, 252 42 Vestec u Prahy, ČR
- Třepačka Vortex typ: REAX top
 - Výrobce: Heidolph instrumenst GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Strasse 12, 911 26 Schwabach, Německo
- Termoblok a odpařovací zařízení: Pierce Reacti. Therm Heating/Stirring Module
 - Typ: 18971 a 18821
 - Výrobce: THERMOSCIENCETIFIC, 28 Scheneck Parkway, Asheville, Severní Karolína 28803, USA
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A GC Systém
 - Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Kolona HP-88
 - Typ: 100 m x 0,250 mm x 0,20 μ m, teplotní limit od 50 °C do 250 °C, pro dělení methylesterů mastných kyselin
 - Výrobce: Agilent Technologies 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- UV 240 lampa
 - Výrobce: A. Krüss Optronik GmbH, Darmstadt, Německo

- Stříkáací pistole Desaga chromatografie na tenké vrstvě
 - Výrobce: Desaga GmbH D-690 Heidelberg 1, Německo

2.3 Chemikálie a další materiál

a) Deproteinační roztok

- Isopropylalkohol, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 99,8 %, hustota 780 kg/m^3 , $M = 60,1 \text{ g/mol}$, číslo šarže: PP/2015/12107
 - Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- n-heptan, čistý
 - Balení 1000 ml, hustota 680 kg/m^3 , $M = 100,21 \text{ g/mol}$, číslo šarže: PP/2010/14672
 - Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Kyselina trihydrogenfosforečná, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 85 %, hustota 1700 kg/m^3 , $M = 98 \text{ g/mol}$, číslo šarže: 1801230113
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

b) Mobilní fáze pro TLC

- n-hexan, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 99 %, hustota 660 kg/m^3 , $M = 86,18 \text{ g/mol}$, číslo šarže: PP/2014/05928
 - Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Diethylether, p.a., nestabilizovaný
 - Balení 1000 ml, obsah 99,7 %, hustota 714 kg/m^3 , $M = 74,12 \text{ g/mol}$, číslo šarže: 2203060317
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
- Kyselina octová, čistá
 - Balení 1000 ml, obsah 99 %, hustota 1050 kg/m^3 , $M = 60,05 \text{ g/mol}$, číslo šarže: 1907280714
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

c) Detekční činidlo

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

d) Interní standard

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

e) Ostatní chemikálie

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

- Dichlormethan, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 99,5 %, hustota 1330 kg/m³, M = 84,93 g/mol, číslo šarže: 2207100717
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
 - Standard pro TLC: pool plazma
- f) Tlakové láhve
- Dusík: N₂ 4.0, UN 1066
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
 - Helium: He 5.0, UN 1046
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
 - Vodík: H₂ 5.0 ≥ 99, 999
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
 - Vzduch: O₂ 20 %, N₂ 80 %, UN 1956
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
- g) Chromatografické desky
- TLC Silica gel 60, 25 Glass plates 20x20 cm, balení 25 kusů, číslo produktu 1.05721.001
 - Výrobce: Merck spol. s.r.o., 642 71, Darmstadt, Německo

2.4 Postup práce

2.4.1 Denaturace bílkovin a extrakce lipidů

Do zkumavek bylo napipetováno 500 µl vzorku plazmy (nebo standardu), ke kterému byl dále nadávkován deproteinační roztok (2,5 ml), jenž byl připraven smícháním 2-propanolu, n-heptanu a 2M kyseliny fosforečné v poměru 40:20:1. Vzniklá směs byla zamíchána na vortexu a pak se ponechala stát 10 minut při laboratorní teplotě. Po uběhnutí této doby byl přidán 1 ml směsi metanol-toluen v poměru 1:4 a 1,5 ml destilované vody. Vzniklá směs byla centrifugována po dobu deseti minut při 3000 otáčkách/min. Centrifugací byla směs rozdělena na dvě fáze, kde horní organická fáze byla odpipetována do zkumavky a v digestoři byla pod dusíkem odpařena do sucha.

2.4.2 Chromatografie na tenké vrstvě

a) Příprava mobilní fáze

Smícháním 40 ml diethyletheru, 160ml hexanu a 6 ml 96% kyseliny octové byla připraven směs, která byla následně přelita do chromatografické vany, jež se ponechala sytit parami mobilní fáze po dobu 40 minut před vložením chromatografické desky.

b) Příprava chromatografické desky

Na TLC desky byly měkkou tužkou vyznačeny jednotlivé dráhy, start a čelo. Linie startu byla umístěna 2,5 cm od spodního okraje desky, čelo ve vzdálenosti 1 cm od jejího horního okraje. Plocha byla následně rozdělena do 6 drah o šířce 3 cm, přičemž po obou okrajích desky byly vyznačeny 1 cm široké okraje.

c) Vlastní tenkovrstvá chromatografie

K odparku bylo přidáno 75 μ l směsi chloroform-metanol v poměru 2:1. Tato směs byla Pasteurovými pipetami nanesena na startovní čáru chromatografické desky. Mezi jednotlivými nanášecími kroky byl dostatečný časový prostoje, aby došlo k odpaření rozpouštědla. Při nanášení bylo dbáno na to, aby nebyl mechanicky poškozen silikagelový povrch desky. Takto připravená deska byla umístěna do chromatografické vany a ponechala se vyvíjet cca 60 minut, než vzlínající mobilní fáze dosáhla označeného čela. Následně byla vyjmuta z vany a usušena při pokojové teplotě. Tímto bylo dosaženo rozdělení přítomných lipidů do jednotlivých vrstev: fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu.

d) Detekce rozdělených vrstev

Jako detekční činidlo byl použit 2,7-dichlorfluorescein, jenž byl na desku rovnoměrně nanesen rozprašovačem, ale pouze na pole se standardem. Ostatní pozice se vzorky byly před aplikací detekčního činidla ochráněny. Pro podrobnější detekci rozdělených vrstev byla využita UV lampa.

e) Izolace jednotlivých složek

Použitím chromatografie na tenké vrstvě byly lipidy rozděleny na 5 frakcí seřazených dle vzrůstajícího retenčního faktoru, a to na fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu. Dle standardu byly jednotlivé frakce označeny měkkou tužkou tak, že nad horním i pod dolním okrajem

skvrny zbývalo asi 0,5 cm. Takto získaná jednotlivá pole byla vyškrábána z TLC desky do předem označených pyrexových zkumavek s uzávěrem s teflonovým těsněním.

2.4.3 Plynová chromatografie

a) Derivatizace – převedení na methylestery

Do pyrexových zkumavek, ve kterých byly vyškrábané lipidové frakce, byl napipetován 1 ml roztoku interního standardu (C21:0) o koncentraci 9 µg/ml a 1 ml směsi metanol-toluen v poměru 1:4. Následně bylo do zkumavek vloženo magnetické míchadlo a napipetováno 200 µl acetylchloridu, jenž zde slouží jako katalyzátor reakce. Tímto způsobem připravené zkumavky byly uzavřeny víčkem s teflonovým těsněním, umístěny do termobloku vyhřátého na 100 °C společně se zapnutým magnetickým mícháním, kde byly ponechány jednu hodinu.

Po ukončení esterifikační reakce se zkumavky ponechaly vystydnout na laboratorní teplotu a poté do nich bylo přidáno 5 ml 6% vodného roztoku K₂CO₃, který byl použit pro neutralizaci reakce. Následně byla směs 2 minuty intenzivně třepána a centrifugována 10 minut při 3000 otáčkách/min. Tím se směs rozdělila na dvě vrstvy, přičemž horní organická vrstva byla odpipetována do čisté zkumavky a odpařena pod dusíkem v digestoři do sucha. Pak bylo přidáno 100 µl dichlormethanu, promícháno na vortexu a veškerý roztok, který obsahoval zakoncentrované methylestery mastných kyselin, byl přepipetován do chromatografických vialek s insertem a uzavřen víčkem s pryžovým septem. Takto připravené vzorky byly uschovány v mrazáku do doby jejich změření na plynovém chromatografu.

b) Vlastní plynová chromatografie

Uzavřené vialky obsahující připravené vzorky byly naskládány do karuselu a po naprogramování dané sady vzorků byl plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A uveden do chodu. Dle typu vzorku byl zvolen již optimalizovaný teplotní program na koloně, kdy teplota nástřiku byla 230 °C a teplota FID detektoru byla 250 °C.

c) Vyhodnocení výsledků

Pro identifikaci jednotlivých píků mastných kyselin byly použity eluční časy získané ze změření standardního roztoku mastných kyselin. Všechny analýzy byly prováděny s použitím interního standardu.

Získané chromatogramy byly následně integrovány v programu GC ChemStation B04.03 a získaná data byla dále statisticky zpracována v softwaru MS Excel 2013, Statistica 12.

3 Výsledky

3.1 Plynová chromatografie

Plynovou chromatografií byla provedena analýza 32 vzorků plazmy. Po zintegrování ploch píků příslušných kyselin byl proveden přepočít, čímž byly získány koncentrace jednotlivých MK. Získané koncentrace mastných kyselin v daných lipidových frakcích byly dále použity pro výpočet aktivit enzymů $\Delta 9$ -desaturázy, $\Delta 5$ -desaturázy a $\Delta 6$ -desaturázy a následně statisticky zpracovány v programu Statistica 12 a Microsoft Office Excel 2013.

Pro následující statistické analýzy bylo ze všech mastných kyselin v lidském těle vybráno pouze 11 kyselin (viz Tabulka 5), které by mohly mít statistický význam vzhledem k onemocnění DM 2. typu.

Tabulka 5 Použité mastné kyseliny pro statistickou analýzu

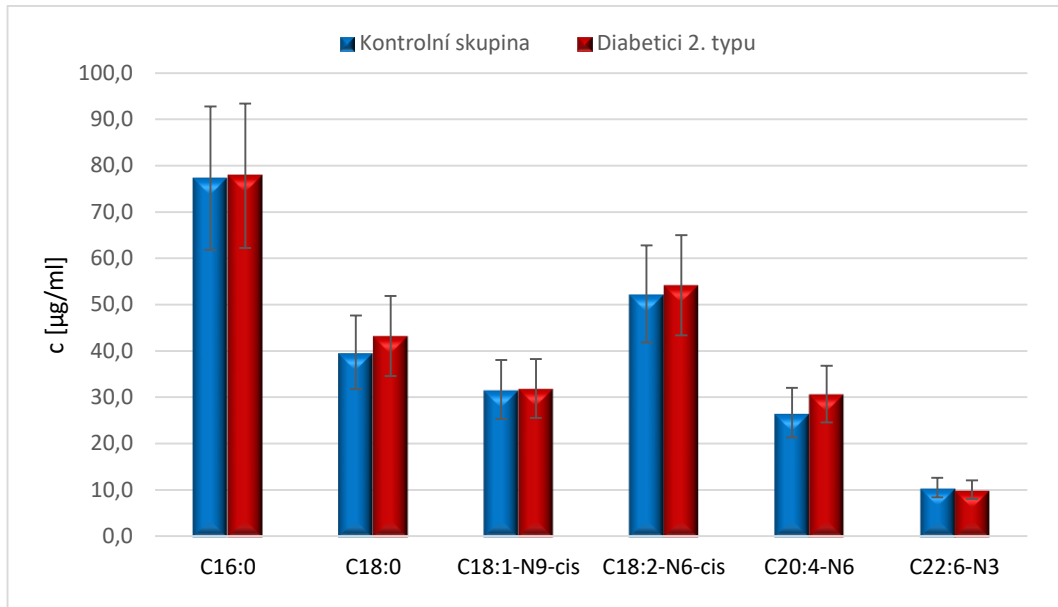
Název kyseliny	Zkratka kyseliny
Palmitová k.	C16:0
Stearová k.	C18:0
Olejová k.	C18:1-N9-cis
Linolová k.	C18:2-N6 cis
γ -Linolenová k.	C18:3-N6
α -Linolenová k.	C18:3-N3
cis-11,14-Eikosadienová k.	C20:2-N6
cis-8,11,14-Eikosatrienová k.	C20:3-N6
Arachidonová k.	C20:4-N6
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3

3.1.1 2D grafy – obsah jednotlivých mastných kyselin v závislosti na onemocnění

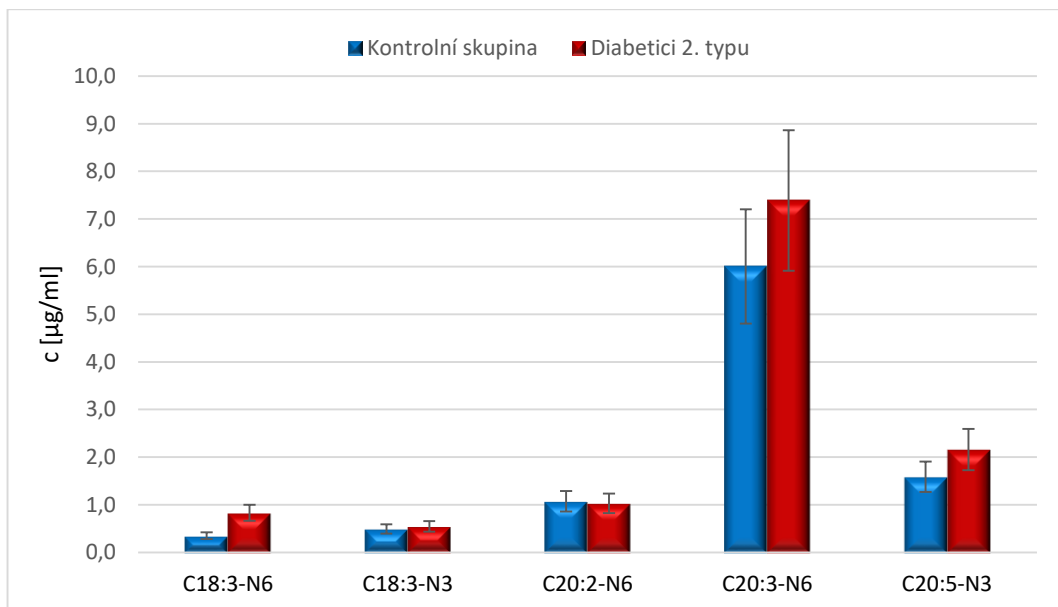
Níže uvedené grafy byly vyhotoveny v programu Microsoft Office Excel 2013. V daných grafech je pozorována závislost průměrné koncentrace EFA v jednotlivých lipidových třídách v závislosti na onemocnění diabetes mellitus typu 2. Jednotlivé vzorky byly rozděleny podle hodnoty glykovaného hemoglobinu na diabetiky 2. typu a kontrolní skupinu (viz Tabulka 4).

3.1.1.1 Fosfolipidy

V následujících Grafech 1 a 2 je patrný mírný nárůst koncentrace všech sledovaných mastných kyselin u diabetiků 2. typu oproti kontrolní skupině. Výjimkou je kyselina dokosaheptaenová a kyselina eikosadienová, která má naopak větší zastoupení u kontrolní skupiny.



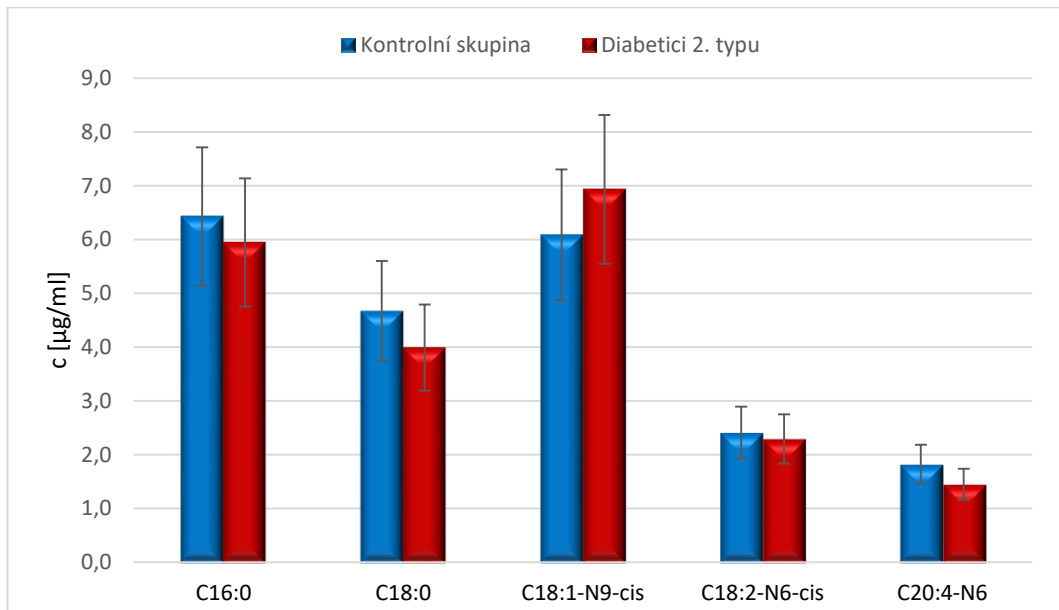
Graf 1 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve PL



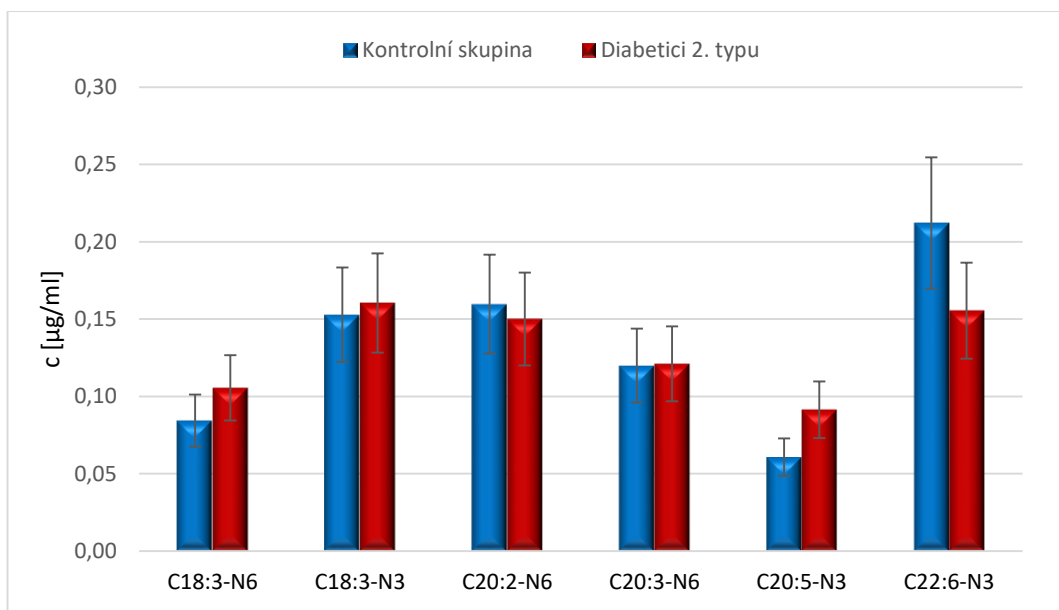
Graf 2 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve PL

3.1.1.2 Diacylglyceroly

V níže uvedeném Grafu 3 je u diabetiků zřejmé zvýšení koncentrace kyseliny olejové oproti kontrolní skupině. Ostatní kyseliny jsou naopak u diabetiků mírně sníženy. Z Grafu 4 pak můžeme pozorovat zvýšenou koncentraci kyseliny dokosahexaenové u kontrolní skupiny oproti diabetikům. Naopak je tomu u kyselin eikosapentaenové a γ -linolenové, které jsou zvýšeny u diabetiků typu 2 v porovnání s kontrolní skupinou. U zbylých kyselin jsou pouze nepatrné rozdíly v koncentracích mezi jednotlivými skupinami.



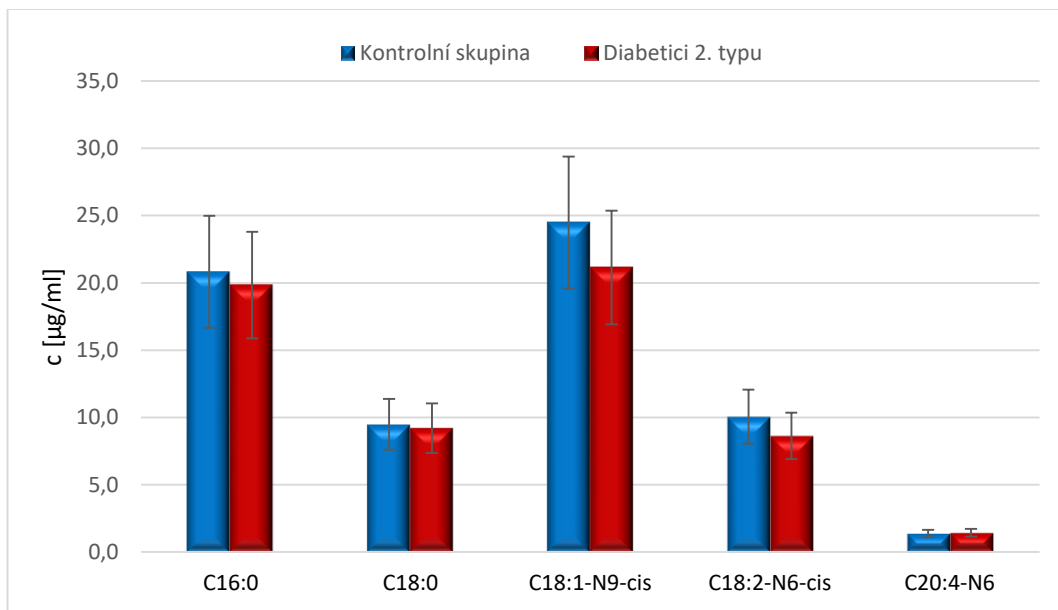
Graf 3 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v DAG



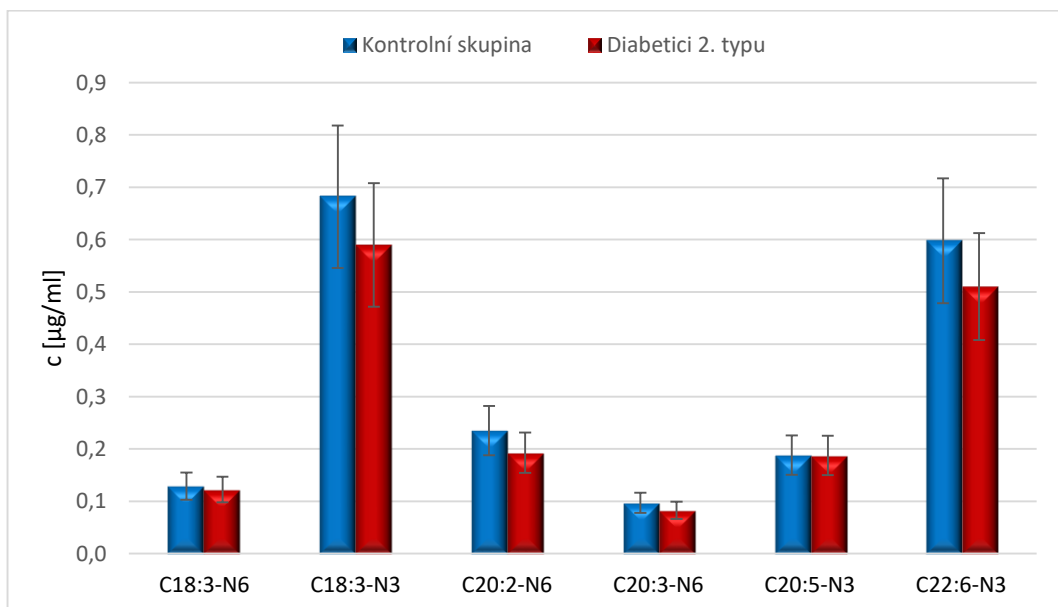
Graf 4 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v DAG

3.1.1.3 Volné mastné kyseliny

Z Grafu 5 a Grafu 6 je patrné, že všechny sledované kyseliny jsou zastoupeny v menším množství u diabetiků oproti kontrolní skupině. Jedinou výjimkou je kyselina arachidonová, která má vyšší koncentraci u diabetiků, nicméně daný rozdíl je minimální. Pouze velmi malé rozdíly koncentrací jsou také u kyseliny stearové, γ -linolenové a eikosapentaenové.



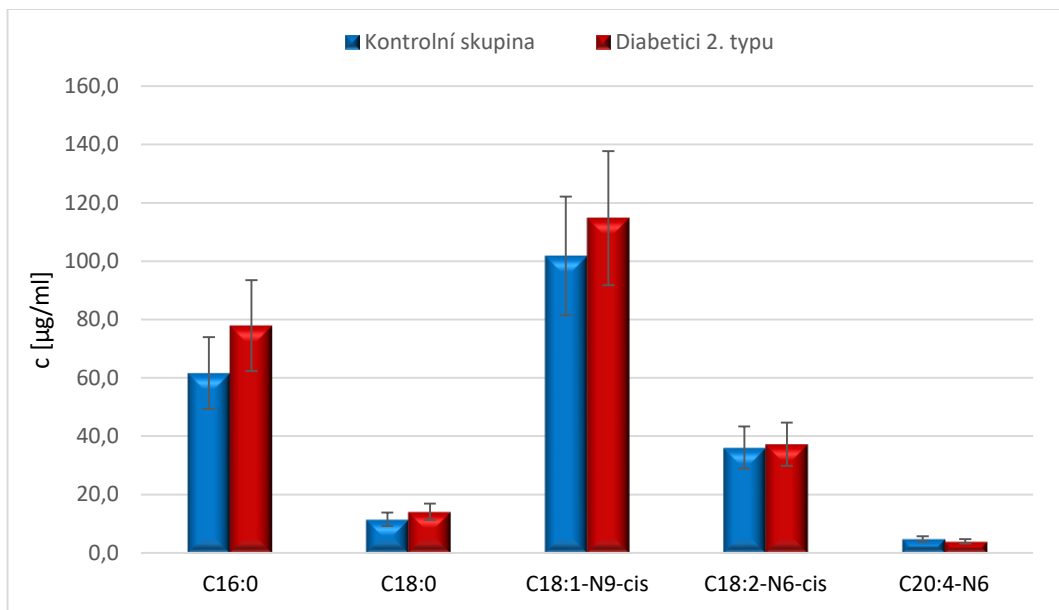
Graf 5 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve VMK



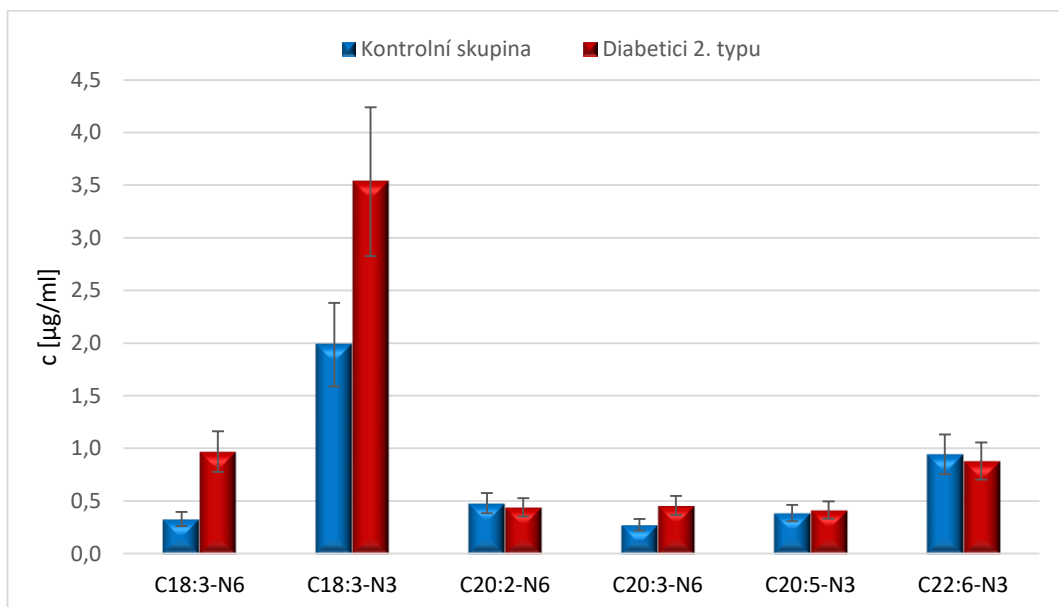
Graf 6 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM ve VMK

3.1.1.4 Triacylglyceroly

Z následujících Grafů 7 a 8 je zřejmé různorodé zastoupení jednotlivých kyselin v závislosti na onemocnění, kdy největší rozdíly jsou u kyseliny palmitové, olejové, γ -linolenové a α -linolenové, jejichž koncentrace jsou zvýšeny u diabetiků. Ostatní kyseliny vykazují pouze nepatrné rozdíly v jejich koncentracích v závislosti na onemocnění diabetes mellitus.



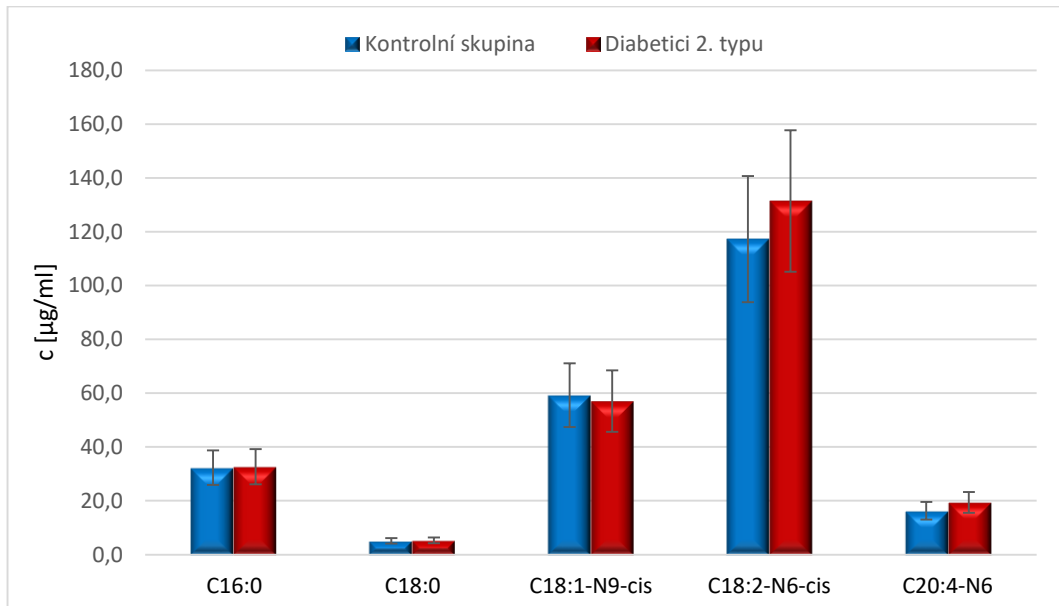
Graf 7 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v TAG



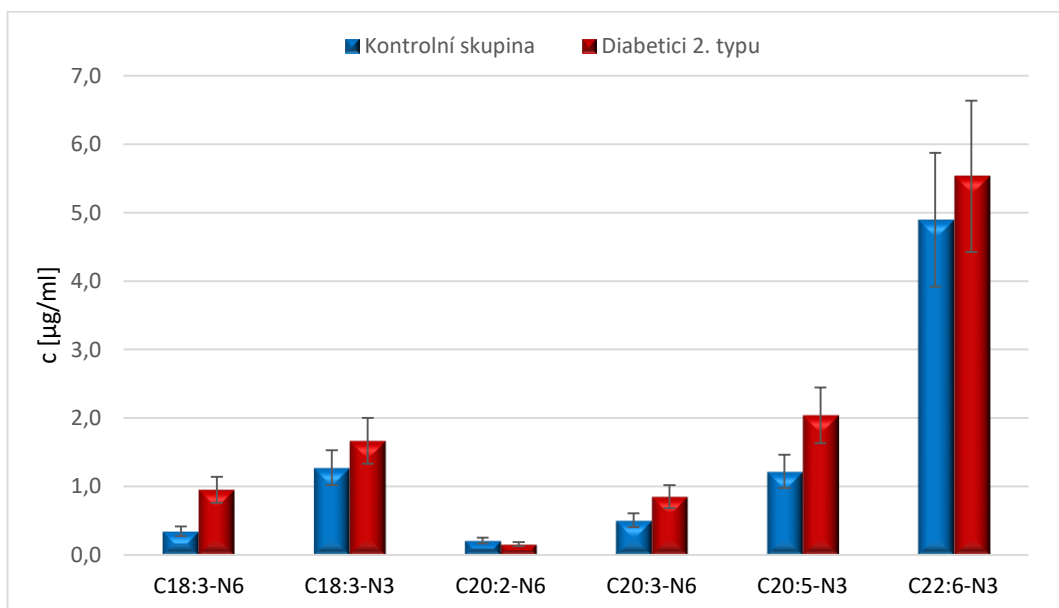
Graf 8 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v TAG

3.1.1.5 Estery cholesterolu

Z Grafu 9 a Grafu 10 je patrné, že ve v lipidové frakci ECH je nejvíce zastoupena kyselina linolová, jejíž koncentrace je navíc zvýšena u diabetiků oproti kontrolní skupině. Ostatní sledované kyseliny vykazují velmi různorodé a daleko nižší koncentrace v závislosti na onemocněním diabetes mellitus typu 2. Dále můžeme pozorovat, že všechny kyseliny řady n-3 jsou zvýšeny u diabetiků ve srovnání s kontrolní skupinou.



Graf 9 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v ECH



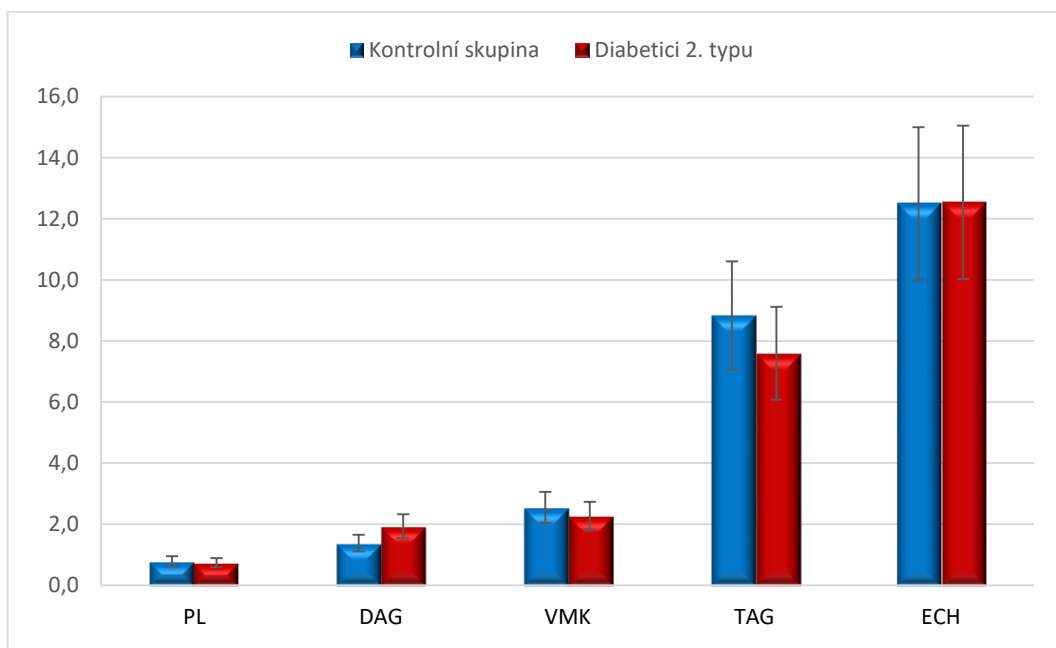
Graf 10 Závislost průměrné koncentrace MK na onemocnění DM v ECH

3.1.2 Aktivita $\Delta 9$ -desaturázy, $\Delta 5$ -desaturázy a $\Delta 6$ -desaturázy v lipidových frakcích v závislosti na onemocnění

Níže uvedené grafy byly zpracovány v MS Excel 2013. Je v nich pozorována aktivita desaturáz v jednotlivých lipidových frakcích v závislosti na onemocnění DM 2. typu.

3.1.2.1 $\Delta 9$ -desaturáza

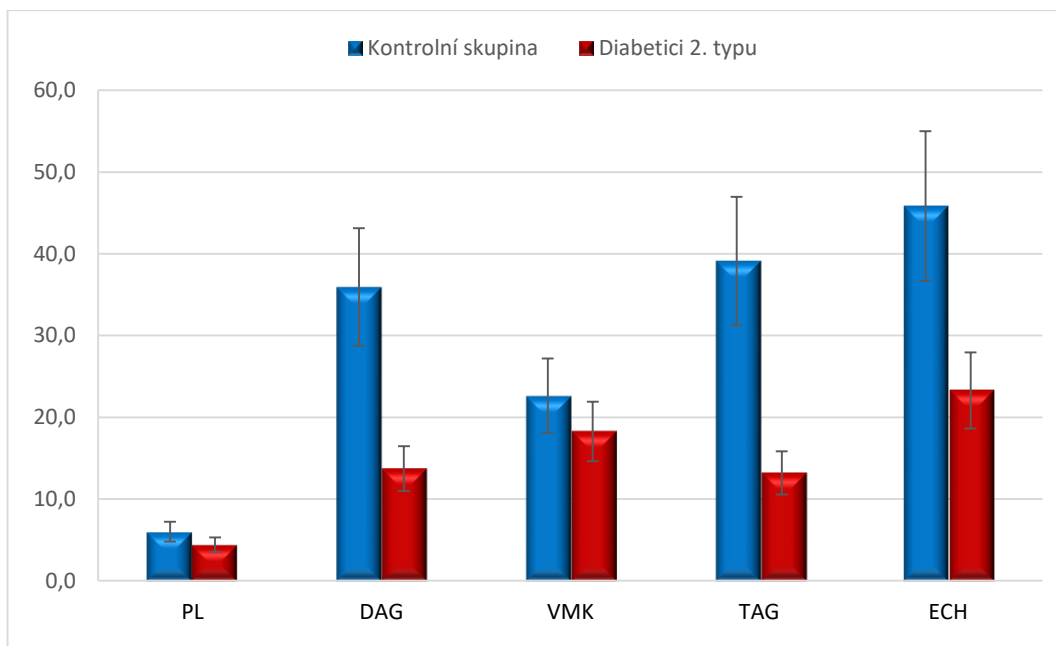
Aktivita $\Delta 9$ -desaturázy je znázorněna v Grafu 6, ze kterého je patrný vzrůstající trend její aktivity v jednotlivých lipidových třídách. Nejnižší aktivita je u fosfolipidů a postupně vzrůstá přes VMK, TAG až k esterům cholesterolu, u kterých její aktivita nejvyšší jak u diabetiků, tak kontrolní skupiny. Ve frakci DAG je zvýšená aktivita u diabetiků vzhledem ke kontrolní skupině. Ve frakcích VMK a TAG je naopak její aktivita u diabetiků snížena a u zbylých dvou lipidových tříd jsou aktivity téměř shodné.



Graf 11 Průměrná aktivita $\Delta 9$ -desaturázy ve všech lipidových frakcích

3.1.2.2 $\Delta 5$ -desaturáza

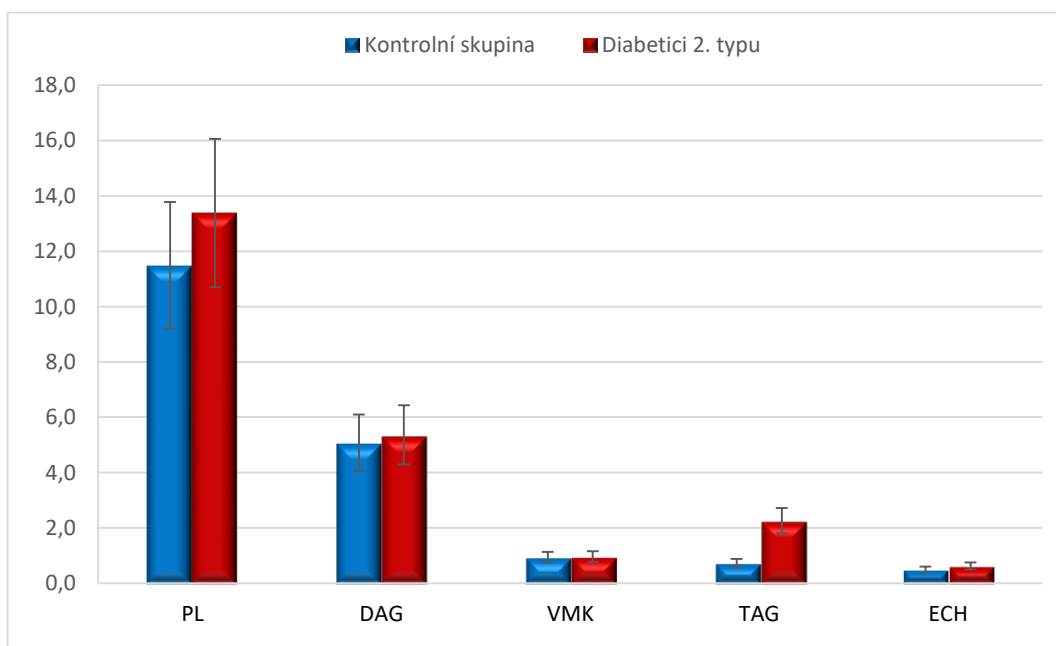
V dále uvedeném Grafu 7 je sledována aktivita enzymu $\Delta 5$ -desaturázy. Z grafu je patrné snížení její aktivity u diabetiků ve srovnání s kontrolní skupinou ve všech lipidových frakcích.



Graf 12 Průměrná aktivita $\Delta 5$ -desaturázy ve všech lipidových frakcích

3.1.2.3 $\Delta 6$ -desaturáza

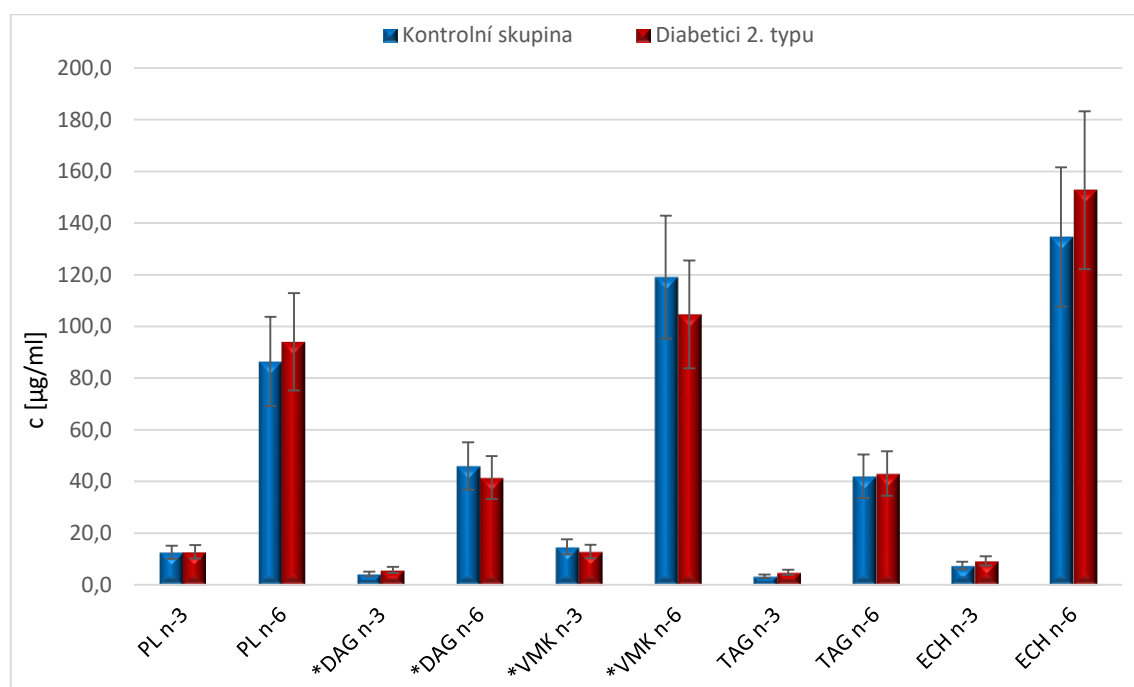
V následujícím Grafu 8 je patrné zvýšení aktivity $\Delta 6$ -desaturázy u diabetiků ve frakci fosfolipidů a diacylglycerolů. V těchto dvou frakcích je její aktivita zároveň několikanásobně vyšší než v ostatních lipidových třídách. Zvýšení její aktivity u diabetiků můžeme také pozorovat ve frakci TAG. Ve volných mastných kyselinách a esterech cholesterolu je však její aktivita přibližně stejná u obou skupin.



Graf 13 Průměrná aktivita $\Delta 6$ -desaturázy ve všech lipidových frakcích

3.1.3 Srovnání obsahu mastných kyselin řady n-3 a n-6 u kontrolní skupiny a diabetiků 2. typu

V Grafu 9 je sledována suma průměrných koncentrací n-3 a n-6 mastných kyselin v jednotlivých lipidových frakcích v závislosti na onemocnění diabetes mellitus 2. typu. Z grafu je patrné, že ve všech třídách je zvýšený obsah n-6 mastných kyselin oproti kyselinám n-3. Dále můžeme u diabetiků ve srovnání s kontrolní skupinou pozorovat zvýšenou koncentraci kyselin řady n-3 i n-6 ve všech frakcích lipidů kromě volných mastných kyselin a kyselin n-6 ve frakci DAG.

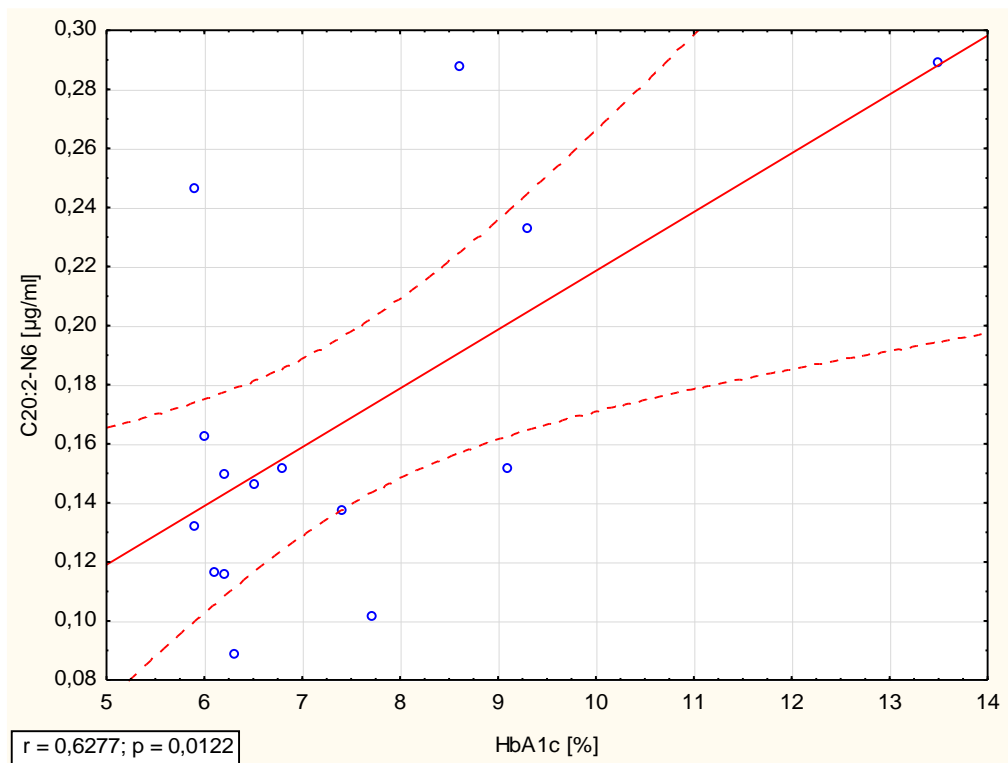


Graf 14 Celková koncentrace sledovaných n-3 a n-6 EFA v jednotlivých lipidových frakcích (*DAG n-3 – původní koncentrace krát 10)

3.1.4 Bodové grafy – závislost esenciálních mastných kyselin na glykovaném hemoglobinu

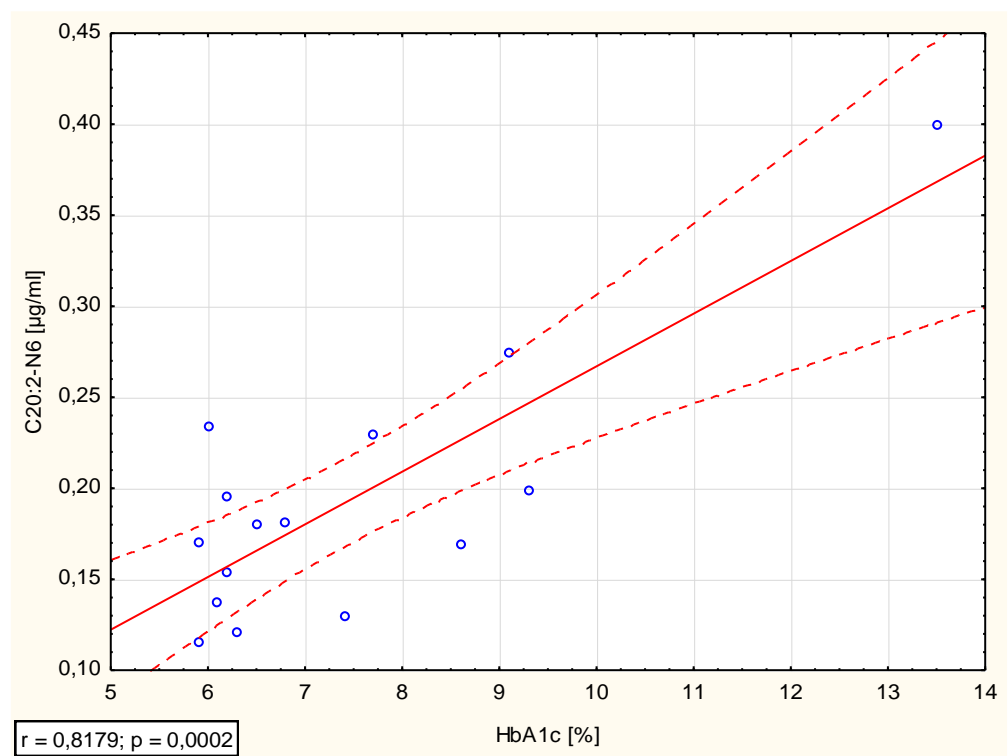
V následujících grafech je vynesena závislost a sledován trend jednotlivých mastných kyselin na glykovaném hemoglobinu (HbA1c). Tyto grafy byly zpracovány v programu Statistica 12. Z mnoha grafů byly vybrány pouze ty, které vykazovaly určitou statistickou významnost.

3.1.4.1 Diacylglycerol



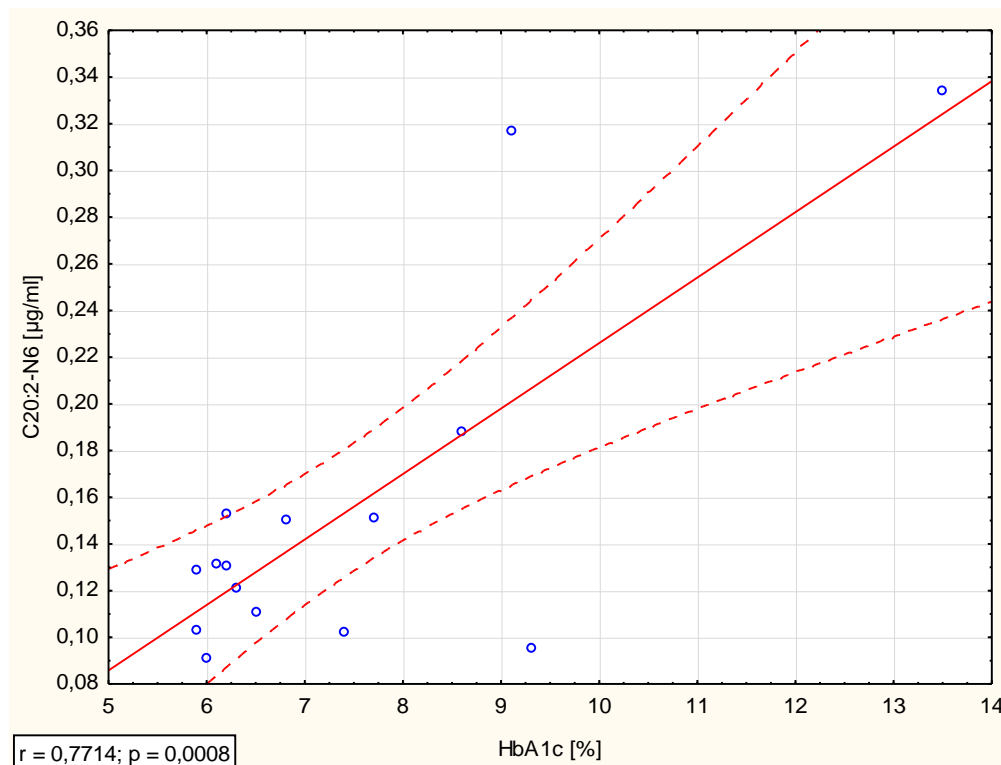
Graf 15 Bodový graf kyseliny eikosadienové v závislosti na HbA1c ve frakci DAG

3.1.4.2 Volné mastné kyseliny



Graf 16 Bodový graf kyseliny eikosadienové v závislosti na HbA1c ve frakci VMK

3.1.4.3 Estery cholesterolu



Graf 17 Bodový graf kyseliny eikosadienové v závislosti na HbA1c ve frakci ECH

3.1.5 Rozdíly koncentrací EFA u jednotlivých skupin

Rozdílný obsah jednotlivých sledovaných mastných kyselin byl zkoumán pomocí t-testu v programu Statistica. U každé kyseliny byly sledovány rozdíly koncentrací mezi kontrolní skupinou a skupinou diabetiků 2. typu pro každou lipidovou frakci zvlášť. Statistická významnost je dána hodnotou p , jež byla počítána na hladině významnosti $\alpha \leq 0,0500$.

V Tabulce 6 je patrný pouze jeden statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a diabetiky 2. typu v lipidové třídě fosfolipidů a to u kyseliny γ -linolenové (C18:3-N6). Dále ve frakci diacylglycerolů (viz Tabulka 7) je patrný významný rozdíl u kyseliny eikosapentaenové (C20:5-N3).

Tabulka 6 Výsledková tabulka t-testu pro frakci fosfolipidů

Kyselina	Průměr c [μg/ml] K	Průměr c [μg/ml] D	p	Závěr
C16:0	77,310	77,826	0,9482	-
C18:0	39,727	43,202	0,3730	-
C18:1-N9-cis	31,683	31,887	0,9537	-
C18:2-N6 cis	52,299	54,161	0,7774	-
C18:3-N6	0,349	0,833	0,0001	<i>Významný</i>
C18:3-N3	0,493	0,548	0,6556	-
C20:2-N6	1,076	1,030	0,6494	-
C20:3-N6	6,002	7,386	0,1940	-
C20:4-N6	26,662	30,688	0,1757	-
C20:5-N3	1,586	2,159	0,1454	-
C22:6-N3	10,524	10,069	0,7547	-

(K – kontrolní skupina. D – diabetici 2. typu)

Tabulka 7 Výsledková tabulka t-testu pro frakci diacylglycerolů

Kyselina	Průměr c [μg/ml] K	Průměr c [μg/ml] D	p	Závěr
C16:0	6,428	5,949	0,5826	-
C18:0	4,670	3,992	0,2673	-
C18:1-N9-cis	6,087	6,933	0,4577	-
C18:2-N6 cis	2,413	2,291	0,8000	-
C18:3-N6	0,084	0,113	0,2305	-
C18:3-N3	0,153	0,246	0,0988	-
C20:2-N6	0,160	0,167	0,6939	-
C20:3-N6	0,120	0,125	0,8303	-
C20:4-N6	1,821	1,451	0,0509	-
C20:5-N3	0,061	0,155	0,0256	<i>Významný</i>
C22:6-N3	0,212	0,174	0,3144	-

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

Z následujících dvou tabulek (Tabulka 8 a Tabulka 9) je patrné, že statistická analýza t-test neodhalila žádné významné rozdíly v obsahu mastných kyselin u diabetiků 2. typu a kontrolní skupiny, jak ve frakci volných mastných kyselin, tak i ve frakci triacylglycerolů

Tabulka 8 Výsledková tabulka t-testu pro frakci volných mastných kyselin

Kyselina	Průměr c [μg/ml] K	Průměr c [μg/ml] D	p	Závěr
C16:0	20,822	19,841	0,7344	-
C18:0	9,490	9,212	0,7821	-
C18:1-N9-cis	24,499	21,148	0,4179	-
C18:2-N6 cis	10,064	8,630	0,3707	-
C18:3-N6	0,129	0,122	0,8801	-
C18:3-N3	0,682	0,590	0,6953	-
C20:2-N6	0,235	0,193	0,2477	-
C20:3-N6	0,097	0,083	0,4662	-
C20:4-N6	1,383	1,437	0,7272	-
C20:5-N3	0,188	0,187	0,9836	-
C22:6-N3	0,598	0,510	0,4768	-

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

Tabulka 9 Výsledková tabulka t-testu pro frakci triacylglycerolů

Kyselina	Průměr c [μg/ml] K	Průměr c [μg/ml] D	p	Závěr
C16:0	61,664	77,958	0,4943	-
C18:0	11,494	14,117	0,3317	-
C18:1-N9-cis	101,776	114,753	0,7359	-
C18:2-N6 cis	36,114	37,259	0,9322	-
C18:3-N6	0,329	0,969	0,1176	-
C18:3-N3	1,985	3,533	0,4928	-
C20:2-N6	0,479	0,440	0,7229	-
C20:3-N6	0,275	0,457	0,1864	-
C20:4-N6	4,788	3,954	0,4323	-
C20:5-N3	0,386	0,415	0,8817	-
C22:6-N3	0,944	0,880	0,8389	-

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

V níže uvedené Tabulce 10 jsou uvedeny rozdíly koncentrací mastných kyselin mezi sledovanými skupinami ve frakci esterů cholesterolu. V této lipidové třídě vyšel pro čtyři mastné kyseliny statisticky významný rozdíl v jejich koncentracích u sledovaných skupin. Jedná se o kyseliny: γ -linolenovou, eikosadienovou, eikosatrienovou a eikosapentaenovou.

Tabulka 10 Výsledková tabulka t-testu pro frakci esterů cholesterolu

Kyselina	Průměr c [μg/ml] K	Průměr c [μg/ml] D	p	Závěr
C16:0	32,281	32,683	0,9067	-
C18:0	5,111	5,331	0,8045	-
C18:1-N9-cis	59,289	57,075	0,7670	-
C18:2-N6 cis	117,286	131,395	0,3659	-
C18:3-N6	0,345	0,952	0,0011	<i>Významný</i>
C18:3-N3	1,274	1,665	0,1616	-
C20:2-N6	0,210	0,154	0,0434	<i>Významný</i>
C20:3-N6	0,506	0,850	0,0006	<i>Významný</i>
C20:4-N6	16,298	19,417	0,2680	-
C20:5-N3	1,220	2,038	0,0290	<i>Významný</i>
C22:6-N3	4,897	5,533	0,5866	-

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

4 Diskuze

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, jestli u pacientů s onemocněním diabetes mellitus 2. typu dochází ke změnám v zastoupení esenciálních mastných kyselin a zda mohou být případné změny využity k včasné diagnostice tohoto onemocnění. Dále byla zkoumána aktivita enzymů desaturáz, jež byla následně porovnána s kontrolní skupinou. U daných změn byla sledována jejich závislost na glykovaném hemoglobinu.

V současné době se pro diagnostiku onemocnění diabetes mellitus využívá vyšetření hladiny glukosy v krvi. Screening u nerizikových osob probíhá jednou za dva roky, přičemž se měří hladina glykémie. U osob, které mají zvýšené riziko výskytu tohoto onemocnění, probíhá vyšetření jednou do roka. Jedná se o osoby, které mají diabetes v rodinné anamnéze, věk nad 40 let, trpí obezitou, arteriální hypertenzí, dyslipidemií nebo se u nich vyskytuje porucha v glukosové toleranci. Onemocnění diabetes mellitus je diagnostikováno při výskytu klinických symptomů, které jsou doprovázeny náhodnou glykemií vyšší než 11 mmol/l a následnou hladinou glukosy měřenou na lačno vyšší než 7 mmol/l. Potvrzení diagnózy je provedeno opakovaným vyšetřením hladiny glukosy v krvi nalačno, která musí být vyšší než 7 mmol/l. Pokud se hodnota glykémie nachází mezi 5,6 – 6,99 mmol/l používá se pro diagnostiku DM oGTT – orální glukosový toleranční test (*Seino Y., 2010*).

Diabetes mellitus 2. typu je jedním z projevů metabolického syndromu, jenž je dále spojen s hypertenzí, dyslipidemií a centrální obezitou, což má za následek i zvýšení kardiovaskulárního rizika (*Pelikánová T., 2011*). Existuje proto reálná potřeba zlepšení diagnostických postupů a metod, pomocí kterých by byl diabetes mellitus včas diagnostikován. Současná diagnostika DM je relativně pozdní, protože zvýšená hladina glykémie, glykovaného hemoglobinu a dyslipidémie vznikají v důsledku déletrvajících enzymových poruch a počínající inzulínové rezistence.

Polynenasycené mastné kyseliny vznikají v lidském těle za účasti $\Delta 5$ a $\Delta 6$ -desaturáz. Pro tvorbu polynenasycených MK řady n-3 je výchozí látkou α -linolenová kyselina, ze které následným působením $\Delta 6$ -desaturázy, elongázy a $\Delta 5$ -desaturázy vzniká kyselina eikosapentaenová (EPA). Ta je prekurzorem pro syntézu eikosanoidů s protizánětlivými účinky (*Lee J., 2016*). Z grafu aktivity $\Delta 5$ -desaturázy (Graf 12) v jednotlivých lipidových třídách je patrné snížení její aktivity ve všech lipidových frakcích u diabetiků 2. typu. Tento pokles její aktivity je velmi významný ve frakci diacylglycerolů, které vznikají v enterocytech tenkého střeva

a ve frakcích triacylglycerolů a esterů cholesterolů, které vznikají v játrech. Tento nález je diagnosticky významný, protože charakterizuje orgány postižené diabetem a to v počátku jejich postižení. Pokles aktivity $\Delta 5$ -desaturázy je snadno měřitelný a pro další diagnostické využití bude nutné prostudovat průběh této změny v závislosti na čase u potenciálně ohrožené populace.

Naproti tomu aktivita $\Delta 6$ -desaturázy je zvýšená ve všech lipidových třídách u diabetiků 2. typu oproti kontrolní skupině (Graf 13). Dále můžeme pozorovat i zvýšenou koncentraci kyseliny γ -linolenové (viz Grafy 1 – 10) ve všech lipidových frakcích mimo frakce VMK. Naše výsledky jsou rovněž v souladu s literaturou (Yary T., 2017), která popisuje vzrůst aktivity $\Delta 6$ -desaturázy s progresí metabolického syndromu. Diagnostické využití aktivity $\Delta 6$ -desaturázy je v této literatuře doporučováno. Domníváme se, že bude nutné provedení dalších časových studií její aktivity jako u $\Delta 5$ -desaturázy.

EFA jsou prekurzory rozsáhlé řady bioaktivních mediátorů, které mají účinek na velkou skupinu orgánových receptorů. Jsou schopny ovlivňovat fyziologické pochody v lidském organismu a to prostřednictvím z nich tvořených prostaglandinů, eikosanoidů, leukotrienů a tromboxanů. U nadměrného působení mediátorů z PUFA n-6 může docházet ke zvýšenému riziku vzniku trombóz, aterosklerózy a infarktu (Lands B., 2012). Naopak polynenasycené MK řady n-3 mají pozitivní účinky na metabolismus glukosy a lipidů. Svými účinky snižují hladiny triacylglycerolů, zvyšují koncentrace HDL cholesterolu v plazmě, dále mohou redukovat krevní tlak a vylepšovat inzulínovou senzitivitu. Avšak při příjmu potravy je důležitější poměr n-3 a n-6 EFA než absolutní koncentrace esenciálních kyselin řady n-3 (Wang Y., 2015).

Z Grafu 14 je zřejmé zvýšení koncentrace n-6 mastných kyselin ve všech lipidových frakcích oproti n-3 kyselinám. PUFA řady n-6 jsou také ve větší míře zastoupeny u diabetiků v porovnání s kontrolní skupinou ve frakcích ECH, TAG a PL. Toto zjištění je v souladu s výskytem zdravotních komplikací, které doprovázejí onemocnění diabetes mellitus 2. typu. Esenciální mastné kyseliny řady n-6 jsou transformovány na skupinu zánětlivých eikosanoidů (např. tromboxan A2) a hrají tak významnou roli při neinfekčním zánětu doprovázející toto onemocnění (Takahashi M., 2017).

Velké rozdíly v koncentracích jednotlivých sledovaných mastných kyselin v závislosti na onemocnění DM 2. typu jsou patrné v Grafech 1 – 10. Tyto rozdíly mohou být způsobeny hlavně různým zastoupením jednotlivých EFA ve stravě

zkoumaných jedinců. Koncentrace esenciálních mastných kyselin v potravinách se různí v závislosti na druhu potraviny. Hlavním zdrojem n-6 EFA je slunečnicový olej, v nižších koncentracích se pak nacházejí v oleji ze sezamových semínek, vlašských ořechů a pšeničných klíčků. Naopak mezi významné zdroje n-3 EFA patří lněné semínko a sója. Dále se ve vysokých koncentracích vyskytují v rybách, jako je losos, makrela a tuňák (Tvrzická E., 2011). Je známo, že tyto kvalitní potraviny s vyšším obsahem n-3 EFA jsou drahé a naši občané staršího věku si je většinou nekupují. Proto je incidence diabetu u naší starší populace vysoká a vyvolává vysoké náklady na léčbu a farmakoterapii placené státem.

Je rovněž známo, že metabolické poruchy glukosy a lipidů jsou nejdůležitějšími faktory pro etiologii a patofyziologii DM 2. typu. Bylo již prokázáno, že obezita koreluje s výskytem diabetes mellitus. Dalšími rizikovými faktory je inzulinová rezistence a selhání β -buněk pankreatu, které rovněž korelují s obezitou. Použitím instrumentální techniky GCxGC-TOF-MS byly nalezeny potenciální biomarkery, které signalizují hyperglykémii a deregulaci metabolismu mastných kyselin u obézních diabetiků. Jedná se o kyselinu palmitovou, kyselinu linolovou, kyselinu 2-hydroxyisomáselnou a glukosu. I tyto biomarkery mohou být využity při diagnóze, nebo studiu diabetes mellitu 2. typu (Li X., 2009).

Naše získané výsledky statistické analýzy (viz Tabulky 6 – 10) neprokázaly statistickou významnost změn koncentrací výše uvedených kyselin. Naproti tomu byla zjištěna statistická významnost u kyseliny γ -linolenové (C18:3-N6) ve frakci fosfolipidů a esterů cholesterolu. Jako další můžeme zmínit kyselinu eikosapentaenovou (C20:5-N3), která vyšla statisticky významná ve frakci diacylglycerolů a esterů cholesterolu. Dále vyšly statisticky významné kyseliny eikosadienová (C20:2-N6) a eikosatrienová (C20:3-N6), a to ve frakci ECH. U všech zmíněných kyselin (kromě kyseliny eikosadienové) byly jejich koncentrace u diabetiků 2. typu zvýšené ve srovnání s kontrolní skupinou. Jejich využití pro včasnou diagnostiku onemocnění diabetes mellitus 2. typu je proto rovněž možné.

Tento nález je nový a doposud nebyl v odborné literatuře popsán ani diskutován. Z tohoto důvodu bude nezbytné provést jeho ověření na větším souboru vzorků. Současně bude nutné zohlednit věk pacientů a diagnosticky využít i změny aktivit desaturáz. Vzhledem k tomu, že statisticky významné závislosti byly nalezeny pouze u esenciálních polynenasycených mastných kyselin, bude také nutné při dalším výzkumu sjednotit a normovat složení potravy jak u diabetiků, tak i u kontrolní skupiny.

5 Závěr

V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 32 vzorků plazmy, jež byly podle hodnot glykovaného hemoglobinu rozděleny do dvou skupin na kontrolní skupinu o 17 vzorcích a diabetiky 2. typu o 15 vzorcích. Všechny vzorky byly před analýzou zpracovány jednotným způsobem. Tenkovrstvou chromatografií byl nejdříve každý vzorek rozdělen do 5 lipidových tříd. Následně byla provedena jejich derivatizace a ve formě methylesterů byly analyzovány plynovou chromatografií. Tím byly získány údaje o obsahu polynenasycených mastných kyselin v jednotlivých lipidových frakcích.

Získaná data obsahující koncentrace daných mastných kyselin byla zpracována v programu Microsoft Excel 2013 a navíc podrobena statistické analýze v programu Statistica 12. Statistickou analýzou byly zkoumány korelace, které by mohly objevit nové markery pro diagnostiku diabetes mellitu 2. typu, případně přinést nové poznatky týkající se tohoto onemocnění.

U sledovaných vzorků byly prokázány poměrně značné rozdíly v koncentracích mastných kyselin v závislosti na onemocnění, což je dáno rozdílným složením stravy zkoumaných jedinců. Dále byla zjištěna snížená aktivita $\Delta 5$ -desaturázy ve všech lipidových třídách u diabetiků 2. typu. Tento nález je diagnosticky významný, jelikož charakterizuje orgány postižené diabetem a to v počátku jejich postižení. Naproti tomu byla u diabetiků zjištěna zvýšená aktivita $\Delta 6$ -desaturázy ve všech lipidových frakcích, což ukazuje na progresi metabolického syndromu. Nicméně pro další diagnostické využití bude nutné prostudovat jejich změny v závislosti na čase. Statistickou analýzou byly odhaleny čtyři PUFA, které by se daly využít pro včasnou diagnostiku diabetu. Tento nález je ovšem nový a doposud nebyl v odborné literatuře popsán ani diskutován. Proto jej bude nutné ověřit na větším souboru jedinců, u kterého bude třeba zohlednit a normovat složení potravy.

6 Zdroje

- AHMED N. *Clinical biochemistry*. New York: Oxford University Press, 2011, ISBN 01-995-3393-8.
- BĚLOBRÁDKOVÁ J. a L. BRÁZDOVÁ. *Diabetes mellitus*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006, ISBN 80-701-3446-1.
- BISHOP L. M., E. P. FODY a L. E. SCHOEFF. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6. vyd. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2010, ISBN 978-1-4511-0900-9.
- CAMPBELL M. K. a S. O. FARRELL. *Biochemistry*. 6. vyd. United States: Thomson/Brooks/Cole, 2009, ISBN 978-049-5390-411.
- CAZES J. *Encyclopedia of chromatography*. New York: Dekker, 2003, ISBN 0824741234.
- DAS U. N. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. *Lipids in Health and Disease*. 2008, **7**(1), 37.
- DELARUE J., Ch. LEFOLL, Ch. CORPOREAU a D. LUCAS. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reproduction Nutrition Development*. 2004, **44**(3), 289-299.
- DRÁBKOVÁ P., J. ŠANDEROVÁ, J. KOVAŘÍK a R. KANĎÁR. An assay of selected serum amino acids in patients with type 2 diabetes mellitus. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2015, **24**, 447-451.
- DRESSLEROVÁ I. Diabetes, dyslipidémie a ateroskleróza. *Postgraduální medicína*. 2013, **15**(4), 358-366.
- ESTÉVEZ S. L. a R. HELLEUR. Fatty acid profiling of lipid classes by silica rod TLC-thermally assisted hydrolysis and methylation–GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2005, **74**(1-2), 3-10.

- FAUCI A. S. *Harrison's principles of internal medicine*. 17. vyd. New York: McGraw-Hill Medical, 2008, ISBN 978-0-07-159990-0.
- FUCHS B., R. SÜß, K. TEUBER a kol. Lipid analysis by thin-layer chromatography – A review of the current state. *Journal of Chromatography*, 2011, **1218**(19), 2754-2774.
- GARRETT R. a Ch. M. GRISHAM. *Biochemistry*. 4. vyd. Boston: Brooks/Cole, 2010, ISBN 978-0-495-11464-2.
- GROB R. L. a E. F. BARRY. *Modern practice of gas chromatography*. 4. vyd. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2004, ISBN 0-471-22983-0.
- HAHN-DEINSTROP E. *Applied thin-layer chromatography: best practice and avoidance of mistakes*. 2. upr. a dopl. vyd. Weinheim: Wiley-VCH, 2007, ISBN 978-3-527-31553-6.
- HIGSON S. *Analytical chemistry*. Repr. (with corr.). Oxford: Oxford University Press, 2004, ISBN 978-161-5839-643.
- HODSON L., C. M. SKEAFF a B. A. FIELDING. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research*. 2008, **47**(5), 348-380.
- HOLEČEK M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, ISBN 80-247-1562-7.
- HOWARD B. V. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *Journal of Lipid Research*. 1987, **28**(6), 613-628.
- KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, ISBN 80-863-6907-2.
- KOOLMAN J. a K. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, ISBN 978-80-247-2977-0.
- KRAUSS R. M. Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004, **27**(6), 1496-1504.
- LANDS B. Consequences of Essential Fatty Acids. *Nutrients*. 2012, **4**(12), 1338-1357.
- LEDVINA M., A. STOKLASOVÁ a J. CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0849-9.

- LEE J., H. LEE, S. KANG a W. PARK. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation and biotechnological advances. *Nutrients*. 2016, **8**(1), 23.
- LI X., Z. XU, X. LU a kol. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabonomics: Biomarker discovery for diabetes mellitus. *Analytica Chimica Acta*. 2009, **633**(2), 257-262.
- LUBANDA H. a M. VECKA. Cholesterol - přítel či nepřítel? *Chemické listy*. 2009, **103**(1), 40-51.
- LUPI R., S. DEL GUERRA, V. FIERABRACCI a kol. Lipotoxicity in Human Pancreatic Islets and the Protective Effect of Metformin. *Diabetes*. 2002, **51**(1), 134-137.
- MANNION D. T., A. FUREY a K. N. KILCAWLEY. Free fatty acids quantification in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 2016, **69**(1), 1-12.
- MATOUŠ B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010, ISBN 978-80-7262-702-8.
- MURRAY R. K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd. (4. české vyd.), Jinočany: H&H. 2002, ISBN 80-731-9013-3.
- OGAWA S., K. TOMARU, N. MATSUMOTO a kol. LC/ESI-MS/MS method for determination of salivary eicosapentaenoic acid concentration to arachidonic acid concentration ratio. *Biomedical Chromatography*. 2016, **30**(1), 29-34.
- OREŠIČ, M. Systems biology strategy to study lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2010, **1801**(3), 235-239.
- PELIKÁNOVÁ T. a V. BARTOŠ. *Praktická diabetologie*. 5. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, ISBN 978-80-7345-244-5.
- POREBA M., M. MOSTOWIK, A. SINIARSKI a kol. Treatment with high-dose n-3 PUFAs has no effect on platelet function, coagulation, metabolic status or inflammation in patients with atherosclerosis and type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*. 2017, **16**(1), 1-11.
- RUIZ-RODRIGUEZ A., G. REGLERO a E. IBAÑEZ. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, **51**(2), 305-326.

- RYBKA J. *Diabetes mellitus - komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, ISBN 978-80-247-1671-8.
- ŘEZÁČOVÁ M. a A. STOKLASOVÁ. *Základy biochemie lidského organismu*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2008, ISBN 978-80-246-1510-3.
- SEHL A., L. COUËDELO, L. FONSECA a kol. A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes. *Food Chemistry*. 2018, **251**(7), 1-8.
- SEINO Y., K. NANJO, N. TAJIMA a kol. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*. 2010, **1**(5), 212-228.
- SCHREINER M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1095**(1-2), 126-130.
- TAKAHASHI M., J. ANDO, K. SHIMADA, a kol. The ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids is associated with diabetes mellitus in patients with prior myocardial infarction: a multicenter cross-sectional study. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2017, **17**(1), 1-10.
- TIUCA I., K. NAGY a R. OPREAN. Recent developments in fatty acids profile determination in biological samples - a review. *Revista Romana de Medicina de Laborator*. 2015, **23**(4), 371-384.
- TVRZICKÁ E., L. KREMMYDA, B. STAŇKOVÁ a A. ŽÁK. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 1. *Biomedical Papers*. 2011, **155**(2), 117-130.
- VALENZUELA R. a A. VALENZUELA. Overview about lipid structure. *Lipid Metabolism*. 2013, ISBN 978-953-51-0944-0.
- WALL P. E. *Thin-layer chromatography: a modern practical approach*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005, ISBN 0-85404-535-x.
- WANG Y. a F. HUANG. N-3 Polyunsaturated fatty acids and inflammation in obesity: Local effect and systemic benefit. *BioMed Research International*. **2015**, 1-16.

- Wikibooks. [online]. [cit.2018-03-25]. Dostupné z: https://en.wikibooks.org/wiki/A-level_Applied_Science/Finding_out_about_substances/Chromatography
- YARY T., S. VOUTILAINEN, T.-P. TUOMAINEN a kol. Omega-6 polyunsaturated fatty acids, serum zinc, delta-5- and delta-6-desaturase activities and incident metabolic syndrome. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2017, **30**(4), 506-514.
- ZHENG J., T. HUANG, J. YANG, a kol. Marine N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Are Inversely Associated with Risk of Type 2 Diabetes in Asians: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2012, **7**(9).
- ŽÁK A. a J. MACÁŠEK. *Ateroskleróza: nové pohledy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3052-3.

7 Přílohy

Tabulka 11 Biochemické parametry – diabetici 2. typu

Číslo vzorku	HbA1c [mmol/l]	HbA1c [%]	věk	Cholesterol [mg/dl]	HDL [mg/dl]	LDL [mg/dl]	TAG [mg/dl]
1	45	6,2	65	255	36	89	834
2	78	9,3	49	156	43	99	145
3	124	13,5	40	144	48	87	65
4	43	6,1	34	198	88	93	87
5	70	8,6	54	211	62	149	70
6	76	9,1	20	153	48	100	88
7	41	5,9	46	173	42	118	80
8	51	6,8	45	270	59	207	144
9	47	6,5	69	176	103	57	47
10	41	5,9	57	250	95	136	108
11	57	7,4	79	136	30	67	403
12	42	6,0	56	137	35	75	134
13	45	6,2	73	187	57	114	119
14	61	7,7	75	165	65	44	113
15	45	6,3	21	165	56	97	97

Tabulka 12 Biochemické parametry – kontrolní skupina

Číslo vzorku	HbA1c [mmol/l]	HbA1c [%]	věk	Cholesterol [mg/dl]	HDL [mg/dl]	LDL [mg/dl]	TAG [mg/dl]
1	26	4,5	58	270	19	80	104
2	29	4,8	45	201	39	145	108
3	31	5,0	54	307	64	174	318
4	29	4,8	55	185	55	97	74
5	38	5,6	52	234	40	172	197
6	35	5,4	56	198	95	88	66
7	38	5,7	55	252	73	157	84
8	34	5,3	43	167	51	103	65
9	35	5,3	22	175	64	105	160
10	34	5,3	34	169	89	72	72
11	40	5,8	75	311	71	213	101
12	40	5,8	83	207	55	133	174
13	36	5,5	38	222	55	162	157
14	30	4,9	52	167	61	101	42
15	40	5,8	46	262	36	138	355
16	31	5,0	35	299	86	201	171
17	36	5,4	52	162	43	99	132

Tabulka 13 Koncentrace MK ve fosfolipidech – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	1,659	0,328	0,982	1,246	0,973	0,910	1,019	0,529	0,624	1,092
Pentadekanová k.	C15:0	0,720	0,212	0,767	0,617	0,284	0,571	0,785	0,304	0,398	0,610
Palmitová k.	C16:0	85,683	62,532	108,186	80,727	93,960	85,909	85,935	43,580	73,401	83,528
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	2,950	0,467	1,209	1,908	2,439	2,599	1,633	0,191	0,622	0,596
Heptadekanová k.	C17:0	1,380	0,795	2,020	1,583	1,185	1,419	1,529	0,737	1,198	0,999
Stearová k.	C18:0	41,379	29,694	49,319	48,144	50,699	41,853	44,021	22,468	41,244	30,893
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	1,400	0,659	0,884	2,235	1,627	0,563	0,535	0,353	0,931	0,737
Olejová k.	C18:1-N9-cis	50,693	20,230	35,583	37,307	44,180	36,440	35,615	11,498	34,782	27,090
Linolová k.	C18:2-N6-cis	62,577	34,676	67,095	56,216	69,159	60,539	66,599	24,133	41,364	46,824
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,009	0,007	0,009	0,018	0,008	0,015	0,020	0,396	0,563	0,489
Arachová k.	C20:0	1,049	1,328	2,031	1,507	1,374	1,580	1,640	0,440	0,751	0,668
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,878	0,600	0,526	0,661	1,085	0,458	0,586	0,139	0,376	0,318
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,994	0,097	0,136	0,803	0,553	0,530	0,552	0,323	0,482	0,396
Eikosadienová k.	C20:2-N6	1,286	0,764	1,166	1,297	1,486	1,062	1,022	0,611	0,993	1,084
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	2,198	2,213	2,874	2,720	3,283	4,294	2,806	3,785	8,684	9,838
Behenová k.	C22:0	4,946	5,523	10,643	8,152	11,511	9,595	13,371	3,851	7,903	7,561
Arachidonová k.	C20:4-N6	21,435	25,358	36,410	21,511	30,985	22,232	29,928	18,602	22,057	29,707
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	1,816	0,306	2,425	0,891	3,438	2,278	2,099	1,481	2,311	1,382
Nervonová k.	C24:1-N9	12,699	12,509	14,369	10,241	12,061	14,183	10,564	6,583	7,193	7,695
Dokosaehaenová k.	C22:6-N3	7,787	6,614	13,294	4,694	8,111	7,436	13,780	13,392	13,436	14,139
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	1,234	0,686	0,727	0,780	0,878	0,877	0,815	0,515	0,849	0,883
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	9,832	11,554	12,774	7,974	9,517	5,220	10,752	4,955	2,561	3,045
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	1,243	5,829	3,913	4,420	4,336	6,480	3,849	14,327	19,176	19,191

Tabulka 14 Koncentrace MK ve fosfolipidech – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	11 µg/ml	12 µg/ml	13 µg/ml	14 µg/ml	15 µg/ml	16 µg/ml	17 µg/ml
Myristová k.	C14:0	0,864	0,662	0,935	0,459	0,782	1,039	0,257
Pentadekanová k.	C15:0	0,585	0,422	0,592	0,332	0,454	0,534	0,173
Palmitová k.	C16:0	64,397	69,605	91,348	50,111	74,895	121,641	38,839
Palmitolejová k.	C16:1-cis	0,399	0,951	0,764	0,217	0,347	0,332	0,220
Heptadekanová k.	C17:0	1,199	1,184	1,197	0,839	1,619	1,266	0,665
Stearová k.	C18:0	39,600	38,226	36,881	29,964	56,259	47,179	27,543
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,880	0,852	1,100	0,742	0,801	0,914	0,911
Olejová k.	C18:1-N9-cis	27,002	28,091	34,819	22,171	37,949	39,540	15,628
Linolová k.	C18:2-N6-cis	61,978	47,214	46,196	43,992	66,110	71,655	22,759
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,493	0,603	0,955	0,379	0,598	0,873	0,489
Arachová k.	C20:0	0,661	0,799	0,962	0,605	0,836	1,152	0,699
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,418	0,422	0,421	0,359	0,703	0,328	0,105
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,536	0,757	1,071	0,552	1,042	0,961	0,495
Eikosadienová k.	C20:2-N6	1,114	1,012	1,259	0,831	0,868	1,799	0,645
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	6,912	10,511	10,429	5,175	8,867	11,613	5,836
Behenová k.	C22:0	6,096	8,315	6,570	3,653	6,224	7,725	4,051
Arachidonová k.	C20:4-N6	22,957	22,212	37,227	21,849	26,460	41,634	22,682
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,962	1,643	2,289	1,014	1,395	0,576	0,663
Nervonová k.	C24:1-N9	8,685	6,570	11,795	7,043	13,394	11,446	7,566
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	7,371	11,193	18,697	6,830	7,605	17,009	7,527
	Enzym				Aktivita			
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	0,687	0,740	0,951	0,745	0,679	0,844	0,571
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	3,349	2,131	3,599	4,257	3,009	3,615	3,919
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	10,186	20,336	20,621	10,746	12,251	14,804	23,421

Tabulka 15 Koncentrace MK ve fosfolipidech – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	1,459	0,879	0,700	2,164	0,932	0,875	0,974	1,716	0,974	1,373
Pentadekanová k.	C15:0	0,632	0,395	0,314	0,888	0,594	0,629	0,557	0,767	0,599	0,912
Palmitová k.	C16:0	133,541	75,580	59,167	88,969	81,612	77,038	61,299	97,886	90,266	96,916
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	1,782	1,587	0,531	1,093	0,524	1,212	0,771	2,337	1,270	1,517
Heptadekanová k.	C17:0	1,671	0,977	0,810	1,720	1,631	1,271	1,646	1,948	1,696	2,210
Stearová k.	C18:0	78,146	44,280	34,535	38,865	44,723	32,500	37,406	54,804	48,338	53,211
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,705	0,363	0,559	0,408	0,929	0,694	0,375	0,349	0,514	0,649
Olejová k.	C18:1-N9-cis	46,563	28,547	24,564	39,085	31,724	32,953	28,627	42,291	36,920	46,610
Linolová k.	C18:2-N6-cis	94,148	34,244	39,416	71,875	69,600	48,497	40,651	56,699	58,046	97,616
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	1,602	0,549	0,642	0,776	0,737	0,678	0,933	1,164	0,945	0,939
Arachová k.	C20:0	1,457	1,187	0,905	1,074	1,750	0,949	0,974	1,497	1,001	1,221
α-Linolenová k.	C18:3-N3	1,341	0,214	0,293	0,647	0,744	0,561	0,416	0,780	0,446	1,517
Eikosaenová k.	C20:1-N9	1,040	0,533	0,625	0,809	0,865	1,247	0,633	0,681	0,676	0,946
Eikosadienová k.	C20:2-N6	1,244	0,862	1,139	1,388	0,868	1,045	1,114	1,308	0,809	1,152
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	11,580	5,763	5,882	7,441	6,080	6,270	6,689	10,957	7,682	7,400
Behenová k.	C22:0	10,416	10,464	5,410	8,138	7,604	6,452	7,411	10,520	7,762	8,934
Arachidonová k.	C20:4-N6	41,940	28,595	23,095	28,564	32,091	24,508	23,728	41,611	47,878	26,431
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	5,094	2,045	0,853	2,023	2,925	1,290	1,654	3,914	2,803	2,025
Nervonová k.	C24:1-N9	13,474	9,608	9,012	12,171	13,086	8,749	10,776	11,779	15,129	11,840
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	15,751	7,577	5,737	4,975	9,657	8,240	8,209	11,227	19,625	10,194
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	0,600	0,649	0,716	1,013	0,714	1,021	0,771	0,777	0,769	0,882
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	3,652	5,003	3,959	3,871	5,322	3,942	3,577	3,829	6,284	3,601
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	11,235	15,372	13,630	9,457	7,980	11,808	15,030	17,651	12,089	6,925

Tabulka 16 Koncentrace MK ve fosfolipidech – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	11	12	13	14	15
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	0,817	0,333	0,527	0,247	0,589
Pentadekanová k.	C15:0	0,441	0,159	0,287	0,392	0,361
Palmitová k.	C16:0	75,384	38,480	78,702	62,302	50,249
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	1,132	0,361	0,939	0,501	0,272
Heptadekanová k.	C17:0	1,503	0,785	0,706	1,099	0,749
Stearová k.	C18:0	45,379	28,871	39,623	37,361	29,990
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,647	0,367	0,324	0,352	0,474
Olejová k.	C18:1-N9-cis	31,484	14,374	31,328	25,135	18,106
Linolová k.	C18:2-N6-cis	59,136	28,150	36,092	38,453	39,794
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,839	0,661	0,860	0,616	0,550
Arachová k.	C20:0	0,560	0,340	0,681	0,537	0,407
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,659	0,129	0,205	0,111	0,152
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,350	0,358	0,194	0,383	0,223
Eikosadienová k.	C20:2-N6	1,405	0,611	0,873	1,071	0,567
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	10,685	4,495	10,386	5,274	4,210
Behenová k.	C22:0	6,169	3,198	4,535	4,019	3,317
Arachidonová k.	C20:4-N6	19,350	17,175	41,221	41,299	22,827
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	1,218	0,491	3,837	1,361	0,849
Nervonová k.	C24:1-N9	8,318	7,314	8,404	8,287	5,644
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	8,201	6,183	12,539	14,358	8,560
	Enzym			Aktivita		
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	0,699	0,501	0,796	0,678	0,608
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	1,826	3,853	4,002	7,895	5,467
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	16,504	14,586	26,286	12,529	9,664

Tabulka 17 Koncentrace MK v diacylglycerolech – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	0,595	0,240	0,750	0,488	0,274	0,149	0,191	0,247	0,208	0,234
Pentadekanová k.	C15:0	0,384	0,131	0,256	0,199	0,145	0,073	0,110	0,110	0,070	0,083
Palmitová k.	C16:0	12,610	7,405	9,871	8,979	5,835	4,385	6,534	4,179	5,787	5,177
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	0,400	0,414	0,759	1,309	0,623	0,141	0,297	0,575	0,348	0,323
Heptadekanová k.	C17:0	0,282	0,123	0,203	0,194	0,242	0,101	0,129	0,074	0,110	0,067
Stearová k.	C18:0	10,026	6,214	5,999	5,311	4,383	3,827	5,438	3,639	4,768	3,584
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,474	0,789	1,036	0,535	0,807	0,148	0,722	0,324	0,345	0,436
Olejevá k.	C18:1-N9-cis	5,502	6,244	10,226	6,480	7,285	2,384	5,397	2,938	5,453	3,132
Linolová k.	C18:2-N6-cis	4,087	2,439	2,898	1,603	1,946	1,494	2,551	1,176	1,526	1,783
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,019	0,007	0,006	0,006	0,015	0,006	0,011	0,074	0,119	0,072
Arachová k.	C20:0	0,314	0,137	0,232	0,165	0,195	0,154	0,223	0,073	0,090	0,071
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,141	0,127	0,216	0,116	0,264	0,066	0,152	0,158	0,122	0,166
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,244	0,249	0,379	0,371	0,553	0,202	0,427	0,350	0,498	0,489
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,209	0,204	0,253	0,235	0,190	0,088	0,131	0,182	0,122	0,140
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,123	0,144	0,059	0,044	0,102	0,006	0,013	0,101	0,135	0,204
Behenová k.	C22:0	0,596	0,256	0,342	0,296	0,343	0,336	0,529	0,057	0,060	0,131
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,961	1,084	0,859	0,712	0,749	1,418	1,778	1,867	1,844	2,316
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,113	0,080	0,051	0,076	0,105	0,118	0,081	0,057	0,065	0,037
Nervonová k.	C24:1-N9	0,792	0,409	0,494	0,328	0,335	0,396	0,445	0,105	0,093	0,084
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,429	0,210	0,133	0,194	0,180	0,317	0,343	0,333	0,378	0,192
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	0,553	1,012	1,717	1,229	1,674	0,627	1,000	0,813	1,152	0,880
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	16,120	7,590	14,794	16,180	7,398	246,438	143,069	18,555	13,825	11,468
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	2,741	5,392	1,844	2,526	4,793	0,355	0,449	7,881	8,054	10,434

Tabulka 18 Koncentrace MK v diacylglycerolech – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	11 µg/ml	12 µg/ml	13 µg/ml	14 µg/ml	15 µg/ml	16 µg/ml	17 µg/ml
Myristová k.	C14:0	0,237	0,389	0,157	0,107	0,263	0,304	0,171
Pentadekanová k.	C15:0	0,080	0,102	0,055	0,068	0,110	0,071	0,137
Palmitová k.	C16:0	4,934	5,667	5,777	3,273	7,031	8,014	3,825
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	0,635	0,594	0,337	0,091	0,444	0,719	0,380
Heptadekanová k.	C17:0	0,059	0,092	0,124	0,054	0,110	0,067	0,082
Stearová k.	C18:0	3,797	3,227	3,556	3,171	4,292	5,363	2,796
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,630	0,618	0,836	0,568	0,693	0,643	0,858
Olejová k.	C18:1-N9-cis	5,726	5,917	6,646	3,823	16,876	5,490	3,968
Linolová k.	C18:2-N6-cis	2,586	3,038	2,458	1,320	5,582	3,426	1,115
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,094	0,226	0,206	0,082	0,200	0,194	0,096
Arachová k.	C20:0	0,063	0,116	0,131	0,053	0,042	0,112	0,085
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,135	0,117	0,134	0,111	0,374	0,056	0,143
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,478	0,466	0,820	0,389	0,548	0,411	0,605
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,100	0,153	0,128	0,147	0,155	0,141	0,136
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,088	0,285	0,195	0,102	0,173	0,157	0,109
Behenová k.	C22:0	0,058	0,270	0,163	0,074	0,135	0,097	0,071
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,826	2,591	2,829	1,748	2,093	2,652	2,629
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,010	0,017	0,025	0,059	0,035	0,028	0,074
Nervonová k.	C24:1-N9	0,075	0,191	0,264	0,185	0,250	0,122	0,129
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,171	0,133	0,294	0,030	0,057	0,185	0,028
Enzym		Aktivita						
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	1,519	1,847	1,882	1,214	3,960	1,031	1,429
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	20,881	9,181	14,630	17,318	12,181	17,078	24,319
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	3,115	8,555	7,246	7,043	2,835	4,174	8,932

Tabulka 19 Koncentrace MK v diacylglycerolech – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	0,865	0,320	0,229	0,440	0,233	0,187	0,320	0,433	0,682	0,622
Pentadekanová k.	C15:0	0,156	0,115	0,060	0,190	0,098	0,064	0,163	0,206	0,372	0,366
Palmitová k.	C16:0	13,161	6,206	4,187	5,601	6,173	3,289	4,552	5,695	9,450	5,421
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	1,324	0,693	0,405	0,428	0,429	0,526	0,409	0,376	1,064	1,354
Heptadekanová k.	C17:0	0,206	0,115	0,129	0,139	0,108	0,101	0,123	0,130	0,195	0,143
Stearová k.	C18:0	6,079	4,001	3,340	3,599	5,296	1,710	2,749	3,406	8,649	4,018
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,364	0,341	0,168	0,590	0,512	0,576	0,467	0,669	0,430	0,325
Olejová k.	C18:1-N9-cis	16,272	7,110	2,818	6,497	6,002	7,137	6,371	6,624	5,391	4,990
Linolová k.	C18:2-N6-cis	7,449	1,980	1,450	2,442	1,893	1,050	1,832	1,898	2,619	1,453
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,149	0,102	0,058	0,125	0,081	0,066	0,093	0,076	0,228	0,072
Arachová k.	C20:0	0,414	0,218	0,158	0,205	0,168	0,132	0,115	0,150	0,123	0,118
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,674	0,518	0,202	0,108	0,175	0,700	0,091	0,096	0,293	0,154
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,426	0,292	0,204	0,477	0,540	0,376	0,418	0,460	0,636	0,372
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,150	0,233	0,289	0,117	0,288	0,152	0,132	0,152	0,147	0,247
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,272	0,165	0,079	0,189	0,093	0,055	0,121	0,152	0,164	0,125
Behenová k.	C22:0	0,411	0,313	0,123	0,265	0,132	0,060	0,213	0,251	0,166	0,125
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,584	1,415	1,412	1,293	1,227	1,063	1,679	1,898	1,706	1,485
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,179	0,091	0,094	0,203	0,028	0,029	0,321	0,370	0,394	0,484
Nervonová k.	C24:1-N9	0,755	0,487	0,201	0,221	0,269	0,112	0,148	0,259	0,331	0,129
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,372	0,252	0,136	0,200	0,191	0,078	0,155	0,173	0,120	0,085
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	2,696	1,790	0,850	1,818	1,141	4,203	2,334	1,959	0,628	1,251
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	5,863	8,659	18,127	6,908	13,258	19,595	13,991	12,584	10,487	12,006
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	3,341	7,605	4,946	7,061	4,503	4,759	6,035	7,318	5,721	7,838

Tabulka 20 Koncentrace MK v diacylglycerolech – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	11	12	13	14	15
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	0,524	0,266	0,174	0,144	0,222
Pentadekanová k.	C15:0	0,094	0,060	0,045	0,068	0,072
Palmitová k.	C16:0	7,081	4,452	5,317	4,102	4,544
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	0,684	0,549	0,511	0,319	0,304
Heptadekanová k.	C17:0	0,116	0,109	0,066	0,052	0,084
Stearová k.	C18:0	3,981	2,657	3,745	2,876	3,780
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,386	0,398	0,369	0,296	0,283
Olejová k.	C18:1-N9-cis	9,409	7,040	7,390	5,321	5,618
Linolová k.	C18:2-N6-cis	2,694	2,886	1,666	1,796	1,264
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,137	0,123	0,125	0,147	0,106
Arachová k.	C20:0	0,142	0,047	0,054	0,055	0,088
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,251	0,160	0,092	0,060	0,119
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,439	0,479	0,567	0,388	0,749
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,138	0,163	0,116	0,101	0,089
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,147	0,066	0,091	0,092	0,063
Behenová k.	C22:0	0,110	0,065	0,096	0,068	0,053
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,366	1,325	1,396	1,517	1,398
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,038	0,011	0,021	0,030	0,028
Nervonová k.	C24:1-N9	0,136	0,146	0,146	0,113	0,078
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,161	0,308	0,147	0,150	0,087
	Enzym			Aktivita		
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	2,380	2,668	1,987	1,863	1,497
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	9,348	20,149	15,439	16,679	22,553
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	4,995	2,097	5,000	4,665	4,516

Tabulka 21 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	1,995	1,433	1,686	1,639	1,668	0,639	0,960	0,709	4,286	0,989
Pentadekanová k.	C15:0	0,253	0,285	0,332	0,308	0,204	0,131	0,188	0,167	0,565	0,153
Palmitová k.	C16:0	14,778	26,002	23,360	21,336	25,945	12,868	12,480	13,288	46,079	14,425
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	1,846	2,727	2,522	3,865	4,775	2,235	2,156	1,755	7,910	2,088
Heptadekanová k.	C17:0	0,258	0,467	0,395	0,361	0,328	0,197	0,290	0,237	0,731	0,172
Stearová k.	C18:0	7,694	15,798	11,035	10,371	11,288	7,349	5,351	5,034	10,044	6,963
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,829	1,100	0,897	0,535	0,887	0,542	0,355	0,348	0,463	0,724
Olejová k.	C18:1-N9-cis	15,064	33,340	22,033	26,407	33,445	13,365	16,564	15,610	43,190	13,276
Linolová k.	C18:2-N6-cis	6,826	10,955	8,214	8,401	12,154	5,191	7,306	9,811	19,954	5,568
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,007	0,019	0,016	0,010	0,013	0,009	0,008	0,092	0,509	0,113
Arachová k.	C20:0	0,175	0,246	0,276	0,239	0,360	0,217	0,202	0,050	0,302	0,052
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,718	0,057	0,109	0,164	0,390	0,394	0,630	0,482	1,486	0,297
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,234	0,252	0,127	0,140	0,103	0,172	0,213	0,306	0,519	0,546
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,172	0,554	0,486	0,330	0,243	0,103	0,118	0,222	0,217	0,121
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,061	0,043	0,080	0,054	0,051	0,011	0,011	0,152	0,297	0,067
Behenová k.	C22:0	0,227	0,142	0,210	0,198	0,244	0,139	0,169	0,105	0,174	0,128
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,415	1,029	0,965	0,820	0,925	0,799	0,818	1,894	2,030	1,433
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,300	0,421	0,362	0,211	0,259	0,132	0,117	0,084	0,171	0,034
Nervonová k.	C24:1-N9	0,113	0,290	0,151	0,238	0,148	0,098	0,122	0,015	0,122	0,057
Dokosaehaenová k.	C22:6-N3	0,402	0,328	0,620	0,348	0,424	0,225	0,461	1,321	1,535	0,405
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	1,972	2,126	2,011	2,564	2,984	1,831	3,117	3,123	4,331	1,920
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	23,296	24,303	12,135	15,362	18,141	70,471	73,906	12,584	6,897	21,654
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,820	0,356	0,892	0,585	0,386	0,201	0,140	1,413	1,358	1,095

Tabulka 22 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	11	12	13	14	15	16	17
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	2,270	1,141	1,472	0,482	1,922	1,727	0,965
Pentadekanová k.	C15:0	0,308	0,175	0,187	0,107	0,331	0,241	0,175
Palmitová k.	C16:0	24,939	17,227	22,399	10,470	26,395	27,720	14,258
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	3,752	2,086	3,393	0,511	2,240	3,129	0,913
Heptadekanová k.	C17:0	0,458	0,335	0,447	0,157	0,411	0,298	0,182
Stearová k.	C18:0	11,716	9,168	11,044	7,759	13,247	9,464	8,003
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,588	0,801	0,739	0,565	0,699	0,455	0,500
Olejová k.	C18:1-N9-cis	36,909	21,593	27,578	7,555	50,177	26,701	13,679
Linolová k.	C18:2-N6-cis	15,804	8,468	8,530	4,384	22,720	11,504	5,290
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,187	0,164	0,254	0,083	0,417	0,159	0,131
Arachová k.	C20:0	0,110	0,270	0,143	0,129	0,278	0,121	0,115
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,944	0,717	0,641	0,312	3,418	0,553	0,280
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,585	0,626	0,719	0,256	0,472	0,479	0,362
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,179	0,213	0,209	0,171	0,231	0,244	0,180
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,058	0,120	0,108	0,083	0,164	0,146	0,141
Behenová k.	C22:0	0,217	0,113	0,060	0,055	0,123	0,102	0,110
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,564	1,082	1,788	1,209	1,882	1,869	1,985
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,229	0,301	0,198	0,068	0,215	0,045	0,051
Nervonová k.	C24:1-N9	0,121	0,156	0,045	0,087	0,160	0,107	0,109
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,517	0,726	1,044	0,383	0,491	0,397	0,535
	Enzym				Aktivita			
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	3,173	2,372	2,515	0,981	3,815	2,842	1,721
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	27,241	9,083	16,655	14,728	11,585	12,894	14,211
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,335	1,295	1,159	1,725	0,658	1,161	2,432

Tabulka 23 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	1,624	1,449	1,145	1,382	1,051	1,427	0,962	1,858	1,129	0,724
Pentadekanová k.	C15:0	0,263	0,211	0,181	0,310	0,234	0,271	0,222	0,270	0,273	0,210
Palmitová k.	C16:0	21,730	21,147	19,540	13,806	14,039	14,391	15,172	20,278	16,366	13,988
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	2,077	3,058	1,497	1,388	0,827	1,319	1,685	3,711	2,415	0,921
Heptadekanová k.	C17:0	0,255	0,290	0,352	0,303	0,259	0,320	0,318	0,422	0,334	0,236
Stearová k.	C18:0	7,190	9,185	10,186	4,853	8,426	7,002	6,614	8,900	8,258	10,792
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,510	0,487	0,803	0,357	0,380	0,715	0,284	0,512	0,251	0,298
Olejová k.	C18:1-N9-cis	28,325	22,342	20,995	11,812	13,569	12,794	14,386	23,244	14,574	7,909
Linolová k.	C18:2-N6-cis	11,673	6,336	8,675	6,632	6,714	4,852	7,345	8,039	5,996	5,625
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,077	0,012	0,065	0,045	0,289	0,305	0,094	0,109	0,104	0,129
Arachová k.	C20:0	0,446	0,307	0,308	0,251	0,098	0,062	0,253	0,258	0,261	0,180
α-Linolenová k.	C18:3-N3	1,901	0,272	0,360	0,391	0,401	0,255	0,321	0,478	0,266	0,347
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,194	0,166	0,349	0,214	0,655	0,234	0,179	0,343	0,244	0,166
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,154	0,199	0,399	0,138	0,169	0,275	0,170	0,181	0,180	0,116
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,107	0,053	0,064	0,077	0,050	0,074	0,090	0,133	0,075	0,093
Behenová k.	C22:0	0,162	0,129	0,123	0,160	0,070	0,079	0,158	0,140	0,087	0,100
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,118	1,134	1,634	0,901	0,972	1,133	1,908	1,690	1,666	1,562
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,289	0,207	0,246	0,210	0,111	0,200	0,187	0,312	0,106	0,129
Nervonová k.	C24:1-N9	0,273	0,100	0,154	0,096	0,039	0,043	0,172	0,126	0,104	0,054
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,375	0,380	0,338	0,163	0,242	0,255	0,577	0,553	0,722	0,203
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	3,968	2,450	2,076	2,451	1,622	1,840	2,190	2,630	1,777	0,738
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	10,587	21,393	25,658	11,805	19,794	15,409	21,404	12,826	22,536	16,966
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,834	0,770	0,676	1,060	0,674	1,396	1,118	1,510	1,135	1,508

Tabulka 24 Koncentrace MK ve volných mastných kyselinách – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	11	12	13	14	15
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	2,436	1,377	1,922	1,668	0,615
Pentadekanová k.	C15:0	0,267	0,177	0,230	0,250	0,146
Palmitová k.	C16:0	25,497	20,425	37,072	32,581	11,587
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	2,244	4,075	7,145	3,311	0,960
Heptadekanová k.	C17:0	0,349	0,340	0,524	0,487	0,214
Stearová k.	C18:0	11,889	8,704	15,969	13,040	7,179
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,651	0,647	0,716	0,620	0,353
Olejová k.	C18:1-N9-cis	25,943	27,962	44,395	41,399	7,577
Linolová k.	C18:2-N6-cis	9,897	15,872	11,493	15,015	5,284
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,123	0,082	0,153	0,186	0,062
Arachová k.	C20:0	0,233	0,242	0,389	0,278	0,192
α-Linolenová k.	C18:3-N3	1,405	0,751	0,697	0,689	0,315
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,227	0,255	0,365	0,315	0,330
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,130	0,234	0,196	0,230	0,121
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,098	0,076	0,117	0,076	0,062
Behenová k.	C22:0	0,131	0,069	0,107	0,076	0,083
Arachidonová k.	C20:4-N6	0,963	1,188	2,335	1,682	1,673
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,154	0,182	0,327	0,096	0,056
Nervonová k.	C24:1-N9	0,133	0,145	0,164	0,129	0,019
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,328	0,700	1,342	0,913	0,564
	Enzym			Aktivita		
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	2,198	3,236	2,800	3,197	1,063
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	9,887	15,696	20,198	22,343	27,374
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,906	0,439	0,927	0,462	1,065

Tabulka 25 Koncentrace MK v triacylglycerolech – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	9,372	2,645	13,750	3,809	3,916	1,459	4,040	0,864	3,683	3,584
Pentadekanová k.	C15:0	1,256	0,697	2,806	0,874	0,414	0,362	0,820	0,309	0,624	0,487
Palmitová k.	C16:0	66,028	63,732	201,595	51,807	55,855	28,064	43,454	24,318	64,741	41,465
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	8,709	6,657	30,816	9,335	13,520	6,011	9,535	2,181	8,104	8,075
Heptadekanová k.	C17:0	1,343	0,522	3,222	0,879	0,911	0,327	0,825	0,348	1,334	0,653
Stearová k.	C18:0	19,031	10,668	25,237	8,839	12,221	5,909	6,652	8,064	21,095	7,210
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	2,522	0,637	2,954	0,567	0,178	0,352	0,333	0,174	0,449	0,654
Olejová k.	C18:1-N9-cis	101,260	107,505	305,503	94,613	109,227	53,958	80,061	33,644	71,852	42,526
Linolová k.	C18:2-N6-cis	25,264	33,779	79,406	25,896	26,729	14,621	32,299	13,900	15,380	21,285
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,027	0,037	0,042	0,085	0,056	0,027	0,020	0,122	0,620	0,252
Arachová k.	C20:0	0,506	0,363	1,500	0,817	0,933	0,422	0,751	0,143	0,494	0,186
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,974	0,565	1,230	0,376	0,341	0,965	2,199	0,507	0,823	1,036
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,396	0,488	1,312	0,347	0,360	0,803	0,964	0,517	0,851	0,981
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,708	0,494	0,987	0,409	0,260	0,297	0,420	0,307	0,322	0,393
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,106	0,080	0,247	0,318	0,204	0,020	0,017	0,138	0,302	0,208
Behenová k.	C22:0	0,439	0,276	0,653	0,572	0,360	0,198	0,514	0,123	0,211	0,246
Arachidonová k.	C20:4-N6	2,172	2,774	6,022	3,352	2,849	2,675	4,076	3,716	4,009	4,460
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,566	0,172	0,601	0,406	0,381	0,249	0,545	0,095	0,210	0,112
Nervonová k.	C24:1-N9	0,450	0,501	0,918	0,214	0,192	0,348	0,310	0,067	0,086	0,151
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	1,385	0,595	1,064	0,538	0,293	0,472	1,111	0,719	0,654	0,566
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	5,359	10,149	12,192	10,780	9,002	9,196	12,121	4,202	3,430	5,940
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	20,749	34,795	24,559	10,623	14,098	134,301	237,473	27,137	13,371	21,600
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,382	0,217	0,284	1,122	0,696	0,125	0,049	0,907	1,795	0,893

Tabulka 26 Koncentrace MK v triacylglycerolech – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	11 µg/ml	12 µg/ml	13 µg/ml	14 µg/ml	15 µg/ml	16 µg/ml	17 µg/ml
Myristová k.	C14:0	3,714	7,836	6,681	2,489	8,719	3,714	0,919
Pentadekanová k.	C15:0	0,668	0,972	1,128	0,397	1,398	0,668	0,330
Palmitová k.	C16:0	35,363	91,243	93,905	25,049	103,320	35,363	22,980
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	7,067	17,109	15,306	2,656	8,621	7,067	4,020
Heptadekanová k.	C17:0	0,643	1,535	1,578	0,441	1,715	0,643	0,312
Stearová k.	C18:0	7,873	13,331	11,641	5,904	20,575	7,873	3,267
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,660	1,332	0,608	0,445	0,843	0,660	0,425
Olejová k.	C18:1-N9-cis	50,291	147,324	151,153	39,404	254,047	50,291	37,532
Linolová k.	C18:2-N6-cis	23,320	55,837	37,346	13,299	98,705	23,320	73,561
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,329	0,677	0,407	0,213	1,806	0,329	0,544
Arachová k.	C20:0	0,150	0,450	0,272	0,161	1,108	0,150	0,432
α-Linolenová k.	C18:3-N3	1,518	5,019	2,375	0,838	12,979	1,518	0,488
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,845	2,209	3,271	0,487	3,202	0,845	0,217
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,334	0,955	0,670	0,291	0,821	0,334	0,141
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,143	0,538	0,452	0,179	0,839	0,143	0,731
Behenová k.	C22:0	0,131	0,505	0,289	0,056	0,383	0,131	0,631
Arachidonová k.	C20:4-N6	3,776	5,375	6,305	3,345	6,449	3,776	16,270
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,179	0,529	0,509	0,135	0,575	0,179	1,111
Nervonová k.	C24:1-N9	0,050	0,546	0,275	0,177	0,495	0,050	0,027
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,279	1,430	2,503	0,313	0,739	0,279	3,110
	Enzym				Aktivita			
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	6,433	11,130	13,078	6,722	12,436	6,433	11,572
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	26,614	10,070	14,055	18,840	7,746	26,614	22,457
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,560	0,880	1,106	1,229	0,777	0,560	0,907

Tabulka 27 Koncentrace MK v triacylglycerolech – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	5,073	7,643	2,084	5,922	4,149	5,775	2,608	9,307	1,259	6,187
Pentadekanová k.	C15:0	3,029	1,027	0,381	0,927	0,889	1,085	0,547	1,187	0,409	0,968
Palmitová k.	C16:0	376,381	108,412	42,185	51,322	44,885	62,701	45,147	94,358	31,792	56,069
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	34,761	17,176	3,889	3,721	3,202	6,896	4,085	19,427	4,750	5,918
Heptadekanová k.	C17:0	4,483	1,583	0,545	0,778	0,824	1,231	0,618	1,477	0,358	0,996
Stearová k.	C18:0	42,150	19,438	8,523	9,415	9,415	10,684	8,037	14,550	7,747	12,162
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,476	1,410	0,493	0,640	0,771	1,182	0,340	1,060	0,420	0,418
Olejová k.	C18:1-N9-cis	589,805	139,314	66,392	70,468	68,644	79,838	74,859	126,337	54,361	97,661
Linolová k.	C18:2-N6-cis	207,094	26,434	19,706	20,383	25,079	22,389	25,201	30,762	14,779	31,269
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	6,580	0,646	0,284	0,308	0,559	0,362	0,872	1,172	0,496	0,809
Arachová k.	C20:0	2,954	0,560	0,322	0,377	0,487	0,189	0,355	0,432	0,294	0,147
α-Linolenová k.	C18:3-N3	34,593	1,076	0,607	1,175	1,678	1,156	0,787	1,664	0,527	2,758
Eikosaenová k.	C20:1-N9	5,162	1,174	0,780	1,196	0,493	1,163	0,422	1,339	0,476	1,089
Eikosadienová k.	C20:2-N6	1,611	0,742	0,417	0,293	0,369	0,580	0,226	0,309	0,240	0,303
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	1,962	0,559	0,255	0,262	0,328	0,293	0,293	0,365	0,210	0,293
Behenová k.	C22:0	1,732	0,436	0,195	0,229	0,233	0,219	0,193	0,372	0,153	0,242
Arachidonová k.	C20:4-N6	12,451	3,172	2,947	1,786	3,080	2,771	3,376	4,623	3,356	3,196
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	3,088	0,420	0,176	0,064	0,513	0,196	0,072	0,308	0,120	0,102
Nervonová k.	C24:1-N9	1,894	0,376	0,343	0,082	0,265	0,291	0,150	0,210	0,115	0,147
Dokosaehaenová k.	C22:6-N3	4,136	0,747	0,527	0,084	0,599	0,747	0,392	0,808	1,013	0,426
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	14,093	7,218	7,845	7,538	7,343	7,526	9,381	8,745	7,067	8,087
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	6,397	5,723	11,645	6,884	9,455	9,550	11,605	12,760	16,151	11,015
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,866	1,931	1,183	1,172	1,196	1,194	1,063	1,085	1,295	0,854

Tabulka 28 Koncentrace MK v triacylglycerolech – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	11 µg/ml	12 µg/ml	13 µg/ml	14 µg/ml	15 µg/ml
Myristová k.	C14:0	2,498	2,747	3,263	2,357	3,733
Pentadekanová k.	C15:0	0,369	0,555	0,398	0,533	0,724
Palmitová k.	C16:0	25,983	52,449	65,024	55,025	57,638
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	1,816	9,359	14,293	6,651	5,738
Heptadekanová k.	C17:0	0,541	0,719	0,608	0,808	0,735
Stearová k.	C18:0	20,533	10,180	11,873	12,212	14,840
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,426	0,239	0,577	0,472	0,414
Olejová k.	C18:1-N9-cis	19,762	83,076	94,774	85,533	70,473
Linolová k.	C18:2-N6-cis	5,845	48,183	20,052	28,559	33,146
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,339	0,417	0,764	0,482	0,440
Arachová k.	C20:0	0,327	0,354	0,541	0,667	0,292
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,792	1,484	0,924	1,178	2,601
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,350	0,908	0,891	1,163	0,940
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,129	0,500	0,219	0,350	0,314
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	1,263	0,231	0,209	0,151	0,182
Behenová k.	C22:0	1,575	0,215	0,222	0,146	0,177
Arachidonová k.	C20:4-N6	0,795	3,378	5,521	4,949	3,908
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,130	0,100	0,561	0,208	0,165
Nervonová k.	C24:1-N9	0,074	0,093	0,302	0,320	0,232
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,176	0,729	1,280	1,112	0,433
	Enzym			Aktivita		
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	0,969	8,219	8,039	7,054	4,783
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	0,634	14,756	26,666	32,958	21,701
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	19,740	0,438	0,951	0,484	0,500

Tabulka 29 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	3,567	0,991	3,112	2,149	2,342	1,857	2,318	0,714	1,957	2,570
Pentadekanová k.	C15:0	0,068	0,034	0,018	0,016	0,165	0,552	0,735	0,156	0,296	0,283
Palmitová k.	C16:0	42,044	37,602	51,320	34,432	41,039	31,724	38,548	17,267	26,703	24,195
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	14,862	5,725	15,570	12,435	20,581	16,387	10,196	3,566	10,784	13,677
Heptadekanová k.	C17:0	0,568	0,256	0,426	0,283	0,240	0,209	0,250	0,073	0,071	0,107
Stearová k.	C18:0	5,947	4,955	6,199	4,239	7,441	5,912	5,342	3,278	3,438	2,724
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,401	0,180	0,144	0,045	0,120	0,111	0,087	0,016	0,022	0,057
Olejová k.	C18:1-N9-cis	83,548	65,572	96,855	63,767	101,398	64,013	60,239	24,139	56,080	35,333
Linolová k.	C18:2-N6-cis	106,057	138,458	205,912	117,803	176,202	111,258	188,098	78,147	99,474	90,085
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,055	0,061	0,034	0,059	0,049	0,020	0,061	0,305	1,191	0,583
Arachová k.	C20:0	0,765	0,628	2,526	3,020	3,325	1,896	2,438	0,292	1,492	0,867
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,991	0,248	0,896	0,616	1,406	0,423	0,664	0,735	1,951	1,643
Eikosaenová k.	C20:1-N9	1,191	0,292	0,924	0,684	1,760	0,626	0,773	0,092	0,120	0,146
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,384	0,160	0,275	0,273	0,301	0,232	0,210	0,171	0,140	0,205
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,150	0,159	0,263	0,344	0,482	0,272	0,263	0,630	0,826	0,840
Behenová k.	C22:0	0,572	0,917	1,582	1,040	1,319	1,240	2,184	0,665	0,756	1,088
Arachidonová k.	C20:4-N6	10,424	28,059	28,623	14,189	20,462	11,811	23,049	13,304	13,393	15,322
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,994	0,638	1,331	0,628	1,430	0,794	1,188	2,308	2,099	1,009
Nervonová k.	C24:1-N9	0,343	0,219	0,200	0,065	0,086	0,136	0,268	0,173	0,063	0,035
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	4,080	3,959	5,372	2,160	3,577	3,500	5,350	19,554	5,815	3,997
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	14,149	13,329	15,737	15,151	13,724	10,905	11,357	7,416	16,429	13,065
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	69,992	177,470	109,747	41,636	42,761	43,828	88,289	21,304	16,357	18,386
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,129	0,105	0,117	0,266	0,250	0,223	0,128	0,736	0,758	0,852

Tabulka 30 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – kontrolní skupina

Kyselina	Zkratka	11 µg/ml	12 µg/ml	13 µg/ml	14 µg/ml	15 µg/ml	16 µg/ml	17 µg/ml
Myristová k.	C14:0	0,221	2,052	2,432	1,856	1,705	1,058	4,941
Pentadekanová k.	C15:0	0,056	0,282	0,441	0,406	0,361	0,169	0,659
Palmitová k.	C16:0	7,652	27,794	39,129	26,568	28,014	23,896	50,855
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	0,858	12,255	11,737	5,965	3,820	4,248	4,964
Heptadekanová k.	C17:0	0,042	0,137	0,078	0,087	0,098	0,025	0,114
Stearová k.	C18:0	6,056	3,275	5,091	2,866	3,769	3,477	12,877
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,018	0,045	0,074	0,118	0,055	0,041	0,220
Olejová k.	C18:1-N9-cis	5,582	55,625	70,813	48,413	55,664	36,513	84,365
Linolová k.	C18:2-N6-cis	19,501	126,332	141,890	130,938	141,756	97,571	24,391
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,082	1,128	0,684	0,462	0,584	0,233	0,280
Arachová k.	C20:0	0,081	1,660	1,110	0,751	1,043	0,345	0,406
α-Linolenová k.	C18:3-N3	0,221	2,185	2,428	2,165	2,239	1,086	1,758
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,089	0,218	0,630	0,168	0,228	0,071	1,051
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,067	0,154	0,215	0,185	0,180	0,147	0,267
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,131	0,999	1,061	0,664	0,539	0,536	0,442
Behenová k.	C22:0	0,133	1,277	1,108	0,609	0,729	0,600	0,457
Arachidonová k.	C20:4-N6	1,645	14,414	30,047	15,536	17,730	16,377	2,683
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,094	2,014	2,491	1,452	1,513	0,446	0,312
Nervonová k.	C24:1-N9	0,031	0,140	0,106	0,084	0,056	0,038	0,159
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	0,262	4,493	6,149	4,514	4,482	5,028	0,953
	Enzym				Aktivita			
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	0,928	17,104	14,010	17,012	14,876	10,576	6,598
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	12,619	14,549	28,566	23,599	33,176	30,790	6,122
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,616	0,722	0,683	0,463	0,347	0,502	1,655

Tabulka 31 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Myristová k.	C14:0	1,758	0,714	1,265	3,218	2,326	2,506	1,945	5,013	1,818	2,442
Pentadekanová k.	C15:0	0,226	0,311	0,227	0,497	0,494	0,426	0,342	0,518	0,390	0,469
Palmitová k.	C16:0	40,042	23,134	29,264	36,610	35,037	31,712	33,218	49,233	37,187	32,714
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	9,417	9,311	6,233	11,069	6,438	9,950	7,108	25,328	10,105	9,859
Heptadekanová k.	C17:0	0,171	0,199	0,136	0,113	0,226	0,120	0,126	0,176	0,119	0,103
Stearová k.	C18:0	8,476	5,045	5,278	2,982	4,002	4,435	5,013	9,152	4,767	3,725
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,084	0,092	0,078	0,029	0,056	0,107	0,049	0,132	0,026	0,019
Olejová k.	C18:1-N9-cis	66,639	42,029	52,750	65,587	66,002	65,132	59,932	91,114	60,912	58,516
Linolová k.	C18:2-N6-cis	141,393	68,310	121,140	164,154	190,868	132,066	136,073	172,439	149,614	168,099
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	1,238	0,643	0,391	0,588	1,367	0,469	1,221	2,185	1,411	0,689
Arachová k.	C20:0	2,085	0,937	0,839	1,074	1,679	0,668	1,734	2,806	1,452	1,072
α-Linolenová k.	C18:3-N3	3,091	0,551	0,853	1,721	2,788	1,602	1,649	2,489	1,258	2,635
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,256	1,277	0,237	0,188	0,244	0,250	0,228	0,201	0,197	0,287
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,153	0,096	0,334	0,131	0,189	0,317	0,103	0,150	0,111	0,129
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,889	0,703	0,808	1,006	0,760	0,815	1,077	1,148	0,998	0,822
Behenová k.	C22:0	1,054	1,089	0,796	1,010	0,860	0,934	1,116	1,700	0,908	0,803
Arachidonová k.	C20:4-N6	18,202	13,358	16,778	17,291	20,375	17,135	17,685	32,383	34,022	15,669
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	3,314	1,329	1,043	1,975	2,612	1,132	1,851	4,828	2,678	1,358
Nervonová k.	C24:1-N9	0,169	0,100	0,090	0,120	0,219	0,123	0,060	0,122	0,017	0,088
Dokosaehaenová k.	C22:6-N3	5,468	0,995	3,296	5,684	6,475	5,375	6,181	7,835	7,695	4,870
Enzym		Aktivita									
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	7,918	8,391	10,066	22,155	16,611	14,791	12,040	10,027	12,869	15,822
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	20,637	19,159	20,931	17,334	27,028	21,206	16,561	28,444	34,390	19,226
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,575	0,940	0,609	0,560	0,364	0,564	0,723	0,608	0,609	0,447

Tabulka 32 Koncentrace MK v esterech cholesterolu – diabetici 2. typu

Kyselina	Zkratka	11 µg/ml	12 µg/ml	13 µg/ml	14 µg/ml	15 µg/ml
Myristová k.	C14:0	1,616	0,898	1,969	1,098	1,744
Pentadekanová k.	C15:0	0,244	0,153	0,156	0,228	0,314
Palmitová k.	C16:0	20,472	25,501	34,585	32,043	29,492
Palmitoolejová k.	C16:1-cis	7,122	5,505	16,917	5,596	5,833
Heptadekanová k.	C17:0	0,108	0,086	0,072	0,208	0,095
Stearová k.	C18:0	2,265	3,146	3,053	10,883	7,750
Elaidová k.	C18:1-N9-trans	0,001	0,016	0,024	0,092	0,047
Olejová k.	C18:1-N9-cis	32,817	34,854	64,267	53,844	41,737
Linolová k.	C18:2-N6-cis	78,371	100,976	107,677	112,579	127,162
γ-Linolenová k.	C18:3-N6	0,373	0,450	1,849	0,896	0,505
Arachová k.	C20:0	0,464	0,512	2,266	1,381	0,803
α-Linolenová k.	C18:3-N3	1,876	0,607	1,687	1,000	1,176
Eikosaenová k.	C20:1-N9	0,146	0,133	0,174	0,258	0,155
Eikosadienová k.	C20:2-N6	0,103	0,091	0,131	0,152	0,121
Eikosatrienová k.	C20:3-N6	0,836	0,447	1,109	0,812	0,525
Behenová k.	C22:0	0,991	0,523	1,004	0,763	0,576
Arachidonová k.	C20:4-N6	5,910	12,434	28,685	24,246	17,082
Eikosapentaenová k.	C20:5-N3	0,520	0,931	4,264	1,362	1,374
Nervonová k.	C24:1-N9	0,038	0,046	0,079	0,235	0,097
Dokosahexaenová k.	C22:6-N3	8,104	3,191	6,773	5,364	5,683
	Enzym			Aktivita		
Δ9-desaturáza	18:1/18:0	14,590	11,157	21,201	4,983	5,424
Δ5-desaturáza	20:4-N6/20:3-N6	7,128	28,017	26,084	30,121	32,789
Δ6-desaturáza x100	20:3-N6/18:2-N6	0,974	0,405	0,941	0,659	0,377