

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

PORUCHY METABOLISMU MASTNÝCH KYSELIN U
ADRENOLEUKODYSTROFIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Aneta Tošovská

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. Ing. Alexander Čegan CSc.

KONZULTANT PRÁCE: Mgr. Lucie Stříbrná Ph.D.

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Tošovská**
Osobní číslo: **C16481**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Poruchy metabolismu mastných kyselin
u adrenoleukodystrofie**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

- 1) Prostudujte současnou odbornou literaturu o adrenoleukodystrofii se zaměřením na poruchy metabolismu plazmatických mastných kyselin.
- 2) Popište metodiku klinicko-biochemické diagnostiky adrenoleukodystrofie pomocí tenkovrstevné a plynové chromatografie plazmatických lipidů.
- 3) Zaměřte se na stanovení aktivity lipogenních enzymů a popište lipidové a enzymové poruchy jejich metabolismu u nemocných adrenoleukodystrofií.

Experimentální část:

1. Výběr nemocných a zdravých osob (srovnávací skupina) proveďte podle koncentrace vyšších nasycených mastných kyselin (C20 - C26) z rutinních analýz klinicko-biochemické laboratoře Univerzity Tübingen.
2. Proveďte chromatografickou separaci lipidových tříd EDTA plazmy na tenké vrstvě.
3. Pomocí plynové chromatografie stanovte koncentrace mastných kyselin v jednotlivých třídách lipidů.
4. Vypočítejte a porovnejte koncentrace mastných kyselin a aktivity lipogenních enzymů v jednotlivých třídách lipidů u nemocných a kontrolní skupiny.
5. Vyhodnoťte diagnostickou využitelnost získaných výsledků a přehledně je prezentujte pomocí grafů a obrázků.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

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

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

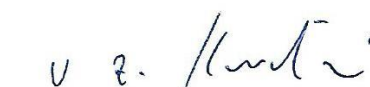
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

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



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlášení autora

Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 nákladu, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 5. 2018

Aneta Tošovská

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu prof. Ing. Alexandru Čeganovi, CSC. a konzultantce paní Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady, připomínky a nasměrování.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Anetě Čákové za pomoc, věcné rady a technické vedení.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá adrenoleukodystrofií, která je charakterizována defektem lipidového metabolismu. Dochází k akumulaci VLCFA v plazmě a tkáních a k defektu peroxizomální β -oxidace.

Pomocí tenkovrstvé chromatografie byly analyzované vzorky rozděleny do pěti lipidových tříd: PL, DG, FFS, TG a CE. Koncentrace jednotlivých mastných kyselin ve frakcích byla dále zjištěna plynovou chromatografií. V této práci bylo využito sedm vzorků plazmy od pacientů trpících adrenoleukodystrofií a deset kontrolních vzorků plazmy od zdravých dobrovolníků.

Dle známých biochemických markerů pro diagnostiku adrenoleukodystrofie byl prokázán různý stupeň onemocnění spojený s věkem pacientů.

KLÍČOVÁ SLOVA

adrenoleukodystrofie, leukodystrofie, mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, esenciální mastné kyseliny, β -oxidace, demyelinizace, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie

ANNOTATION

This diploma thesis deals with adrenoleukodystrophy which is characterized by a defect in lipid metabolism. There is an accumulation of VLCFA in plasma and tissues and defect in peroxisomal β -oxidation.

Using thin-layer chromatography, the analyzed samples were divided into five lipid classes: PL, DG, FFS, TG and CE. Afterwards, the concentration of the individual fatty acids in the fractions was determined by gas chromatography. In this work, seven plasma samples from adrenoleukodystrophy patients and ten plasma control samples from healthy volunteers were used.

According to known biochemical markers for diagnosis of adrenoleukodystrophy, a different degree of disease associated with the age of patients has been proved.

KEYWORDS

adrenoleukodystrophy, leukodystrophy, very long chain fatty acids, essential fatty acids, β -oxidation, demyelination, gas chromatography, thin layer chromatography

OBSAH

1	ÚVOD.....	13
2	TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1	Mastné kyseliny	14
2.1.1	Dělení mastných kyselin.....	14
2.1.2	Fyzikálně-chemické vlastnosti mastných kyselin	15
2.1.3	Syntéza a odbourávání mastných kyselin.....	15
2.1.4	Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem	17
2.1.5	Esenciální mastné kyseliny.....	18
2.2	Peroxizomální ABC transportéry	19
2.3	Nervový systém.....	20
2.3.1	Myelin.....	21
2.4	Leukodystrofie	22
2.4.1	Peroxizomální leukodystrofie a další peroxizomální defekty	23
2.5	Adrenoleukodystrofie.....	26
2.5.1	Výskyt nemoci.....	26
2.5.2	Klinické formy.....	26
2.5.3	Genetický podtext.....	28
2.5.4	Patogeneze	29
2.5.5	Diagnostika.....	30
2.5.6	Terapie	33
2.5.7	Prognóza	34
2.6	Chromatografie	34
2.6.1	Derivatizace	35

2.6.2	Tenkvrstvá chromatografie.....	35
2.6.3	Plynová chromatografie.....	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
3.1	Analyzované vzorky.....	40
3.2	Laboratorní vybavení	40
3.2.1	Přístroje a pomůcky	40
3.2.2	Chemikálie a další používaný materiál.....	42
3.3	Pracovní postup	44
3.3.1	Denaturace proteinů a extrakce lipidů	44
3.3.2	Separace tenkovrstevnou chromatografií	44
3.3.3	Převedení na methylestery – derivatizace	45
3.3.4	Separace plynovou chromatografií	45
3.3.5	Vyhodnocení získaných výsledků	46
4	VÝSLEDKY	47
4.1	Soubor pacientů a kontrol	47
4.2	Plasma	48
4.2.1	Základní ukazatelé X-ALD v lipidových frakcích	48
4.2.2	Aktivitní indexy enzymů	51
4.2.3	Esenciální mastné kyseliny v plazmě	55
4.2.4	Esenciální mastné kyseliny ve frakci PL.....	56
4.2.5	Esenciální mastné kyseliny ve frakci DG.....	57
4.2.6	Esenciální mastné kyseliny ve frakci CE	58
4.2.7	Základní ukazatele X-ALD ve frakci PL.....	59
4.2.8	Kyselina nervonová	60
5	DISKUZE	61
6	ZÁVĚR.....	64
7	POUŽITÁ LITERATURA	65

8	PŘÍLOHA.....	84
---	--------------	----

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Seznam obrázků:

Obrazek 1: Transport acetyl-CoA z mitochondrií do cytosolu cestou citrátu a hlavní zdroje NADPH pro syntézu mastných kyselin.....	16
Obrazek 2: Schéma β -oxidace.....	17
Obrazek 3: Typická struktura ABC transportéru.....	19
Obrazek 4: Schéma neuronu.....	21
Obrazek 5: Vyhodnocení chromatogramu-RF.....	36
Obrazek 6: Schéma plynového chromatografu.....	37
Obrazek 7: Chromatogram.....	39

Seznam grafů:

Graf 1: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 v plazmě.....	48
Graf 1: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci PL.....	48
Graf 3: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci DG.....	49
Graf 4: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci FFS.....	49
Graf 5: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci TAG.....	50
Graf 6: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci CE.	50
Graf 7: Aktivitní indexy enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze v plazmě.....	51
Graf 8: Aktivitní indexy enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze ve frakci PL...52	52
Graf 9: Aktivitní indexy enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze ve frakci DG..53	53
Graf 10: Aktivitní indexy enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze ve frakci CE.53	53
Graf 11: Průměrné porovnání aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou v plazmě.....	54

Graf 12: Průměrné porovnání aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci PL.....	54
Graf 13: Průměrné porovnání aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci DG.	54
Graf 14: Průměrné porovnání aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci CE.	55
Graf 15: Koncentrace ω -6 mastných kyselin v plazmě.	55
Graf 16: Koncentrace ω -3 mastných kyselin v plazmě.	56
Graf 17: Koncentrace ω -6 mastných kyselin ve frakci PL.....	56
Graf 18: Koncentrace ω -3 mastných kyselin ve frakci PL.	57
Graf 19: Koncentrace ω -6 mastných kyselin ve frakci DG.	57
Graf 20: Koncentrace ω -3 mastných kyselin ve frakci DG.	58
Graf 21: Koncentrace ω -6 mastných kyselin ve frakci CE.	58
Graf 22: Koncentrace ω -3 mastných kyselin ve frakci CE.	59
Graf 23: Porovnání průměrných hodnot koncentrací nasycených a ω -9 mononenasycených kyselin u pacientů a kontrol.	59
Graf 24: Závislost růstu kyseliny nervonové na stupni onemocnění ve frakci PL.....	60

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AA: kyselina arachidonová	PPAR: receptory aktivované peroxizomovými proliferátory
ALD: adrenoleukodystrofie	PUFA: polynenasycené mastné kyseliny
ALDP: adrenoleukodystrofický protein	RCDP: rhizomelická chondrodysplasia punctata
AMACRD: deficit 2-methylacyl-CoA racemázy	RD: refsumova choroba
AMN: adrenomyeloneuropatie	REE: klidová energetická potřeba
AOXD: deficit acyl-CoA oxidázy	RFLP: polymorfismus délky restričních fragmentů
ArD: argonový detektor	RP-HPLC: reverzní HPLC
ATP: adenosintrifosfát	SCFA: mastné kyseliny s krátkým řetězcem
CE: estery cholesterolu	SCOT: kolona s kapalinou zakotvenou na nosiči na vnitřní stěně kapiláry
CNS: centrální nervová soustava	SD: směrodatná odchylka
CT: počítačová tomografie	SSCP: polymorfismus konformace na nosiči jednovláknové DNA
CV: variační koeficient	FFS: volné mastné kyseliny
DAB: diaminobenzidin	FID: plamenově ionizační detektor
DBPD: deficit D-bifunkčního proteinu	GC: plynová chromatografie
DG: diacylglyceroly	HDL: lipoproteiny o vysoké hustotě
DHA: kyselina dokosaheptaenová	HeD: heliový detektor
DHAPAT: rhizomelická chondrodysplasia punctata 2	HLA: hlavní histokompatibilní systém
DHCA: kyselina dihydroxycholestanová	HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie
dHPLC: denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie	HSCT: transplantace hematopoetických kmenových buněk
ECD: detektor elektronového záchytu	IL-1 (IL-6): interleukin-1 (interleukin-6)
EDTA: kyselina ethylendiamintetaoctová	IRD: infantilní Refsumova choroba
ELOVL1: ELOVL elongáza 1 mastných kyselin	IS: interní standard
EPA: kyselina eikosapentaenová	MK: mastné kyseliny
FAME: methyl deriváty mastných kyselin	
PLP: proteolipid protein	
PNS: periferní nervová soustava	

LA: kyselina linolová
LCFA: mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LDL: lipoproteiny o nízké hustotě
MCFA: mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem
MK: mastné kyseliny
MR: magnetická rezonance
MS: hmotnostní spektrometrie
MS/MS: tandemová hmotnostní spektrometrie
NALD: neonatální adrenoleukodystrofie
PCR: polymerázová řetězová reakce
PL: fosfolipidy
PLOT: kolona s absorbentem na vnitřní stěně kapiláry
TG: triacylglyceroly
TCD: tepelně vodivostní detektor

THCA: kyselina trihydroxycholestanová
THP-1: buněčná linie lidských monocytů
TID: termoionizační detektor
TLC: tenkovrstvá chromatografie
TNF: tumor nekrotizující faktor
TR: retenční čas
UPLC: ultra výkonný kapalinový chromatograf
VLCFA: mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem
VLCS: syntáza pro karboxylové kyseliny s velmi dlouhým řetězcem
VLDL: lipoprotein o velmi nízké hustotě
WCOT: kolona s kapalinou zakotvenou na vnitřní stěně kapiláry
X-ALD: X-vázaná adrenoleukodystrofie
ZS: zellwegerův syndrom

1 ÚVOD

Adrenoleukodystrofie je nejčastěji se vyskytovaná dědičná peroxizomální porucha. Incidence je cca 1:17 000, kde se nemoc projevuje hlavně u mužů, i když se může objevit i u žen, ale forma je mnohem mírnější. Gen ABCD1 pro ALD je lokalizován na chromozomu Xq28. Dochází k defektu metabolismu lipidů, přesněji mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA). Díky tomu se VLCFA hromadí ve tkáních CNS, což u pacientů způsobuje demyelinizaci, degeneraci a další vážné symptomy nemoci. Prognóza ALD je velmi špatná, bez adekvátní terapie smrt nastává během několika let.

ALD se diagnostikuje pomocí zobrazovacích technik (MR, CT), dále prostřednictvím neurofyzilogických a biochemických vyšetření (zvýšené VLCFA v plazmě) a molekulárně-genetické analýzy (vymezení mutace ABCD1 genu). Koncentrace VLCFA se získává hlavně plynovou chromatografií. V ČR se mutace ABCD1 genu diagnostikuje v Ústavu dědičných metabolických poruch Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, kdy tato procedura není proplácena zdravotní pojišťovnou.

Velmi důležité pro včasné zachycení přenašečky je prenatální diagnostika a novorozenecký screening. Jestliže se onemocnění neodhalilo už prenatálně, díky novorozeneckému screeningu, může být ihned nasazena léčba a šance na přežití je vyšší. Proto je tento screening v dnešní době nejvíce podporován.

I když v posledních letech došlo k výrazným objevům a zjištěním ohledně neurologických nemocí, pořád je značně množství domněnek, které je třeba potvrdit nebo vyvrátit. U ALD se klinické studie zaměřují hlavně na remyelinizaci, objevení nových léčiv, genové terapie a nových možností diagnostiky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou strukturní složkou lipidů, které spolu s bílkovinami a sacharidy jsou základními kameny živé hmoty. Jsou velmi důležité jako substráty energie, u člověka zahrnují asi 30 % celkového energetického příjmu. Dále jsou nezbytné pro jejich strukturální funkčnost, vyskytují se jako prekurzory signálních molekul, např. prostaglandiny. Pro správný vývoj centrálního nervového systému je jejich příjem nezbytný. Vyskytují se buď nasycené, nebo nenasycené karboxylové kyseliny s uhlíkovým řetězcem dlouhým od 2 až do 36 atomů. Mastné kyseliny jsou volné (neesterifikované) nebo estericky vázané (triacylglyceroly, fosfolipidy, estery cholesterolu) [1, 2, 3].

2.1.1 Dělení mastných kyselin

Většina MK, které se přirozeně vyskytují, má přímý řetězec se sudým počtem (13-30) atomů uhlíku a amfipatickou strukturu, což znamená, že mají jak hydrofobní část (uhlíkatý řetězec), tak i část hydrofilní (karboxylová skupina). Hydrofobní charakter a nižší rozpustnost ve vodě MK se projevuje více, čím je delší.

Mastné kyseliny, které mají delší počet atomů uhlíku než 12, musí být přenášeny ve vazbě na polární sloučeniny. Často se vyjadřují schematickým vzorcem $CN:p n-x$, kde CN (uhlíkové číslo, carbon number) je celkový počet atomů uhlíku, p – četnost dvojných vazeb, x – poloha první dvojně vazby od metylové skupiny (n) [5, 7].

Mastné kyseliny se dělí podle přítomnosti dvojných vazeb na nasycené a nenasycené. Nasycené mastné kyseliny mají jednoduché vazby mezi uhlíky. Nasycené MK jsou například kyselina stearová, palmitová a laurová. Nenasycené mastné kyseliny mají mezi uhlíky i dvojně vazby. V řetězci může být přítomna jak jedna, tak více dvojných vazeb. Podle počtu dvojných vazeb je dále dělíme na mononenasycené a polynenasycené. Mononenasycené MK mají jednu dvojnou vazbu a polynenasycené (PUFA) obsahují dvě a více dvojných vazeb. PUFA se dále klasifikuje podle umístění poslední dvojně vazby na omega-3, kam patří kyselina α -linolenová nebo omega-6, což je například kyselina linolová. Mezi mononenasycené MK patří kyselina olejová.

Dále lze mastné kyseliny dělit podle délky řetězce. Rozeznáváme krátké MK (SCFA), MK se středním řetězcem (MCFA), MK s dlouhým řetězcem (LCFA) a s velmi dlouhým (VLCFA). SCFA se skládají z méně než šest atomů uhlíku, zástupci jsou kyselina octová

(C2:0), propionová (C3:0) a máselná (C4:0). MCFA mají 6-12 atomů uhlíku, kam se řadí kyselina kapronová (C6:0), kaprylová (C8:0), kaprinová (C10:0). LCFA obsahují 14-20 atomů uhlíku. Patří mezi ně kyselina laurová (C12:0), myristová (C14:0), palmitová (C16:0). Nakonec VLCFA se skládají z dvaceti a více atomů uhlíku a zahrnuje kyselinu arachovou (C20:0), behenovou (C22:0) a další [1, 2, 3].

2.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti mastných kyselin

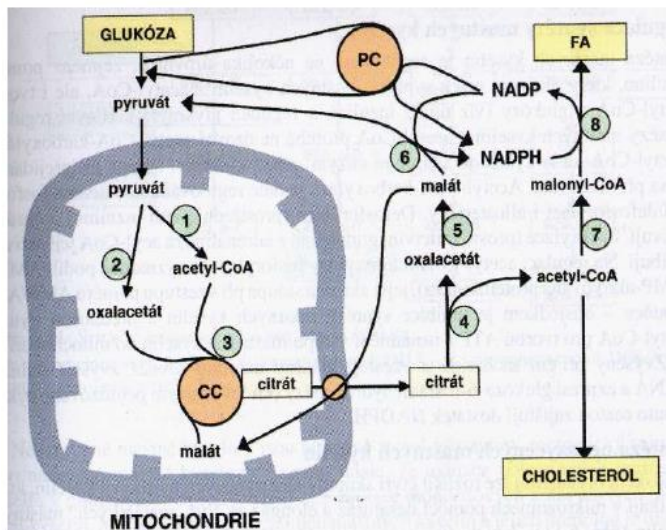
Vlastnosti mastných kyselin, jak fyzikální, tak fyziologické, jsou vázané na délce řetězce a stupni nenasycenosti. Teplota tání MK stoupá s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá se vzrůstajícím počtem dvojných vazeb. Nenasycené MK přirozeně se vyskytující v přírodě na cis-konfiguraci dvojně vazby. Cis-konfigurace způsobuje snižování van der Waalsových interakcí a teploty, protože cis-nenasycený řetězec zaujímá větší prostor. Další vlivy způsobené stupněm nenasycenosti jsou mikroviskozita a tloušťka buněčné membrány. S rostoucím řetězcem klesá rozpustnost MK ve vodě. Jestliže MK narazí na tzv. kritickou micelární koncentraci, začnou se tvořit micely. Karboxylové skupiny v micelách směřují do vodného prostředí a hydrofobní části se orientují směrem dovnitř micely [1, 4].

2.1.3 Syntéza a odbourávání mastných kyselin

Mastné kyseliny se tvoří z dvouuhlíkatých nebo tříuhlíkatých prekurzorů za výskytu přenašeče acylových skupin (acyl carrier protein – ACP), redukované formy nikotinamidadeninfosfátu (NADPH) a acetyl-CoA-karboxylázy. Elongace se v mikrozomální soustavě podílí malonyl-CoA, v mitochondriálním systému acetyl-CoA. Základní látkou pro syntézu mastných kyselin je acetyl-CoA, glukóza je jeho hlavní zdroj, v menší míře laktát a některé aminokyseliny. Acetyl-CoA se musí nejprve transformovat na citrát, protože syntéza mastných kyselin probíhá v cytoplasmě a většina acetyl-CoA je tvořena v mitochondriích, jejichž membrána je pro acetyl-CoA neprůchodná. Ten je přemístěn do cytosolu trikarboxylátovým transportérem a v cytosolu rozštěpen pomocí ATP-citrátlyázy na oxalacetát a acetyl-CoA. Enzym ATP-citrátlyáza je na počátku syntézy mastných kyselin a cholesterolu z acetyl-CoA v cytosolu (viz Obr. 1) [5, 7].

Lidské tkáně jsou schopny vytvářet nasycené MK (SFA) z velké části se sudým počtem uhlíku. Mononenasycené MK (MFA) se syntetizují zavedením dvojně vazby do polohy $\Delta 9$ od uhlíkového atomu karboxylové skupiny. Reakci katalyzuje enzym $\Delta 9$ -desaturáza.

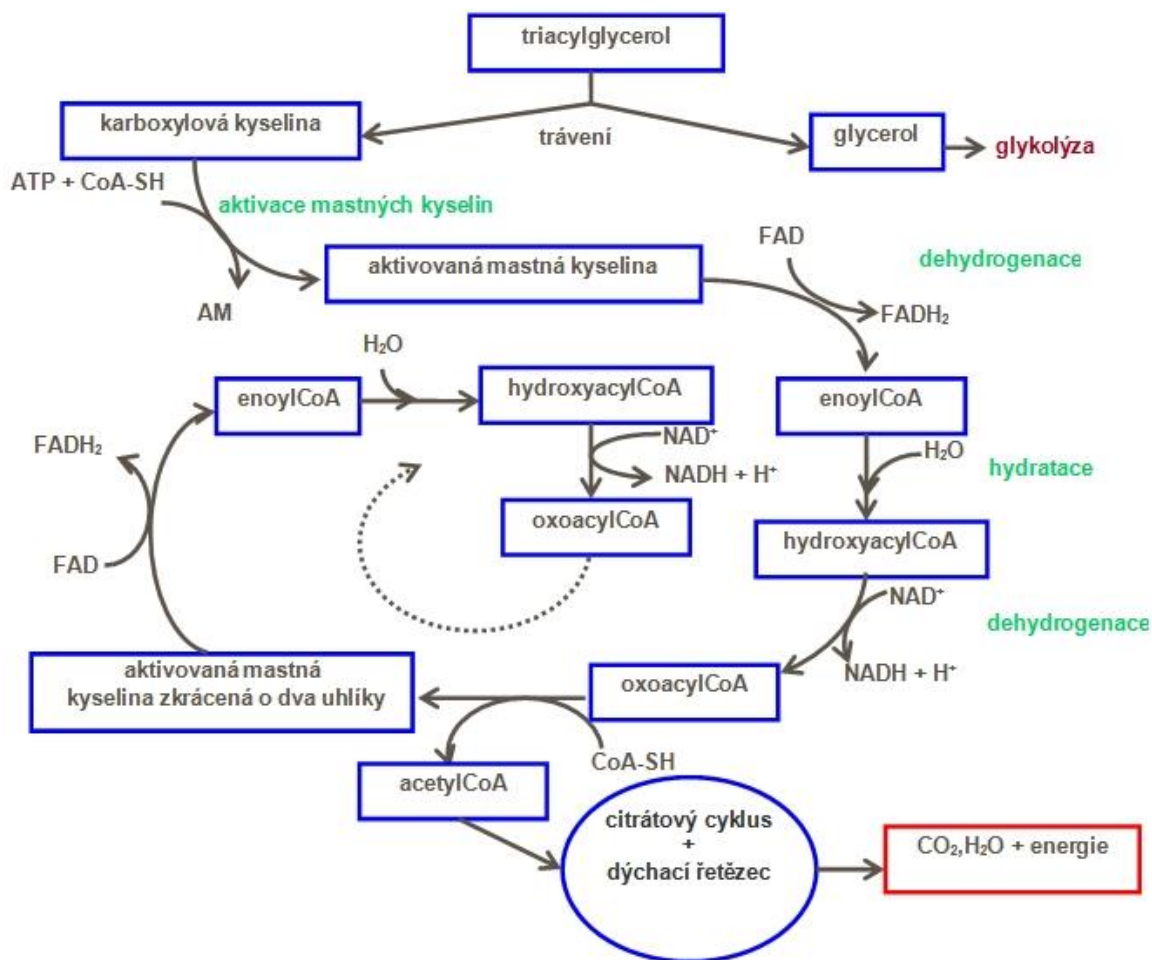
Následkem desaturace kyseliny palmitové (16:0) je kyselina palmitoolejová a u kyseliny stearové (18:0) je kyselina olejová (18:1 n-9) [7].



Obr. 1: Transport acetyl-CoA z mitochondrií do cytosolu cestou citrátu a hlavní zdroje NADPH pro syntézu mastných kyselin z [5].

Vysvětlivky: 1 – pyruvátdehydrogenáza, 2 – pyruvátkarboxyláza, 3 – citrátsyntáza, 4 – ATP-citrátlyáza, 5 – malátdehydrogenáza, 6 – NADP-malátdehydrogenáza („jablečný enzym“), 7 – acetyl-CoA-karboxyláza, 8 – syntéza mastných kyselin, FA – mastných kyselin, CC – citrátový cyklus, PC – pentózový cyklus

K odbourávání mastných kyselin z triacylglycerolů dochází v období hladovění. Enzym triacylglycerol-lipáza katalyzuje odtržení první mastné kyseliny, zbývající dvě MK jsou odpojeny jinými lipázami. Poté dochází k jejich aktivaci esterifikací s CoA, aby MK mohly prostupovat do tkání. V této podobě jsou přeneseny do mitochondrií díky karnitinu a enzymu karnitinacyltransferázy. V mitochondriích začíná β -oxidace, která štěpí mastné kyseliny až na acetyl-CoA. β -oxidace funguje na principu spirály, kdy se při každé otočce odštěpí dva uhlíky jako acetyl-CoA. Dělí se na čtyři hlavní fáze: dehydrogenace, hydratace, dehydrogenace a thiolýza. Nejprve je acyl-CoA transformován pomocí acyl-CoA dehydrogenázy na 2-enoyl-CoA. Za katalýzy enoyl-CoA hydratázy dochází k hydrataci na 3-hydroxyacyl-CoA. Ve třetí reakci dochází ke vzniku β -ketoacyl-CoA prostřednictvím 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy. Nakonec probíhá thiolýza, kde se vytváří acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu, a o dva uhlíky kratší acyl-CoA [1, 5, 6, 7].



Obr 2.: Schéma β -oxidace z [3].

2.1.4 Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem

Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA) zahrnují kyseliny jejichž řetězec je složen z více jak dvaceti atomů uhlíku. Jedná se o kyselinu arachovou (20:0), behenovou (22:0), lignocerovou (24:0), cerotovou (26:0), montanovou (28:0) a melissovou (30:0). V měřitelných koncentracích se tyto kyseliny vyskytují v krevním séru osob s vrozenými metabolickými poruchami (např.: Zellwegerovým syndromem, Refsumovou chorobou, Menkesovou chorobou). Kyseliny behenová, lignocerová a cerotová jsou markery peroxizomálních nemocí, kam patří i adrenoleukodystrofie [1, 8].

2.1.4.1 β -oxidace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem

U VLCFA se β -oxidace odehrává nejen v mitochondriích, ale i v peroxizomech, kde právě začíná. Membrána peroxizomů obsahuje póry, díky tomu není patrně potřeba transportní bílkovina, ale je pravděpodobné, že vstup je zprostředkován transportéry vázající

ATP. Součástí membrány je acetyl-CoA syntáza, která aktivuje VLCFA. Na aktivaci se uplatňuje také adrenoleukodystrofický protein (ALDP), i když tento mechanismus není zcela pochopen. U peroxizomové β -oxidace nedochází ke vzniku energie na rozdíl od tohoto děje v mitochondriích. Jinak se tento proces neliší kromě prvního kroku, kde se dehydrogenací nepřesouvají redukční ekvivalenty do dýchacího řetězce. Přecházejí přímo na kyslík a vzniká peroxid vodíku. Peroxid vodíku je velmi reaktivní a proto problematický, jeho redundantní množství se neprodleně degraduje katalázou na kyslík a vodu. Další probíhající děje jsou totožné jako v mitochondriích, jen se vyskytují jiné enzymy, avšak se stejným efektem. V peroxizomech se nacházejí dvě odlišné acyl-CoA oxidázy, kdy první zprostředkovává oxidaci monokarboxylových kyselin se středně až velmi dlouhým řetězcem. Druhá oxidáza katalyzuje oxidaci CoA esterů 2-methyl-karboxylových kyselin. D-bifunkční protein (DBP) je enzym, jehož prostřednictvím probíhá druhý a třetí krok reakce. Konečný děj je uskutečněn díky dvěma peroxizomálním thiolázám. Zkracování řetězce ustane u délky o 4–6 atomech uhlíku. Za pomoci karnitinu jsou tyto zlomky přeneseny do mitochondrií, kde se rozkládají za vzniku acetyl-CoA [12, 13, 14, 15, 16, 17].

2.1.5 Esenciální mastné kyseliny

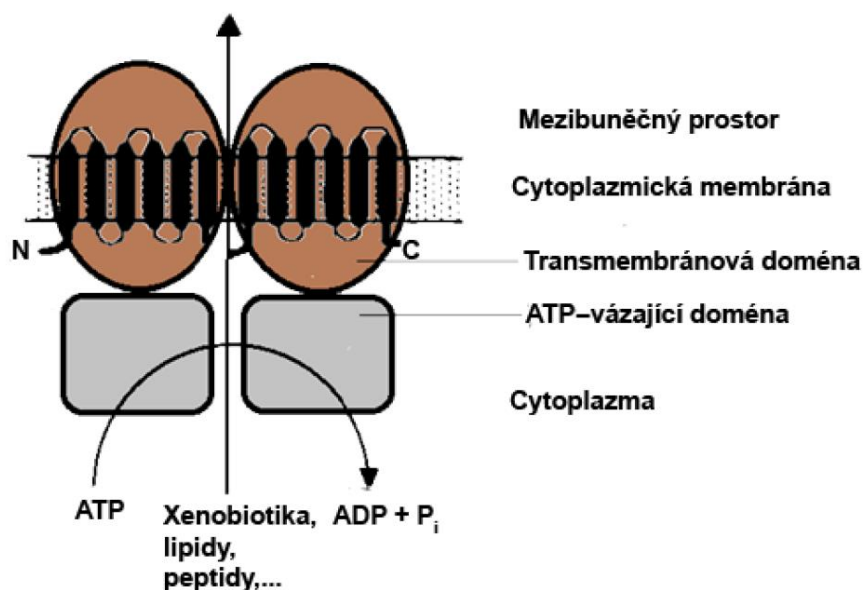
Esenciální mastné kyseliny nedokáže organismus vytvořit, proto je jejich jediným zdrojem strava. Neesenciální mastné kyseliny se syntetizují v celém těle i mozku. Mezi hlavní esenciální mastné kyseliny patří omega-3 a omega-6. Omega-3 se vyskytuje převážně v mořských rybách, pak dále i řepkovém oleji a lněném semínku. Zástupci omega-3 MK jsou kyselina dokosahexanová, eikosapentaenová a α -linolenová. Zdrojem Omega-6 MK jsou rostlinné oleje, patří sem kyselina linolová, která se transformuje v těle na kyselinu arachidonovou [2].

Zejména omega-3 mají zvláštní úlohu v nervovém systému, proto jsou tam i ve vysokých koncentracích. Mozkové buňky potřebují pro své dělení a vývoj právě tyto MK. Jestliže nervový systém strádá, je dokázáno, že dochází ke vzniku abnormalit a vadám buněk i organel. To vše může vést k neurosenzorickým defektům a nestálého chování. K dalším kladům patří, že se účastní předcházení výskytu kardiovaskulárních chorob a neuropsychiatrických onemocnění, například u Alzheimerovy choroby. Tyto MK mají také vliv na přepravu živin, buněčné interakce a stavbu membrán [18, 19, 20].

Většinou se klinické studie nezaobírají samotnými omega-6 MK, ale spíše řeší poměr s omega-3. Tato MK je součástí v určitém počtu všech potravin [18].

2.2 Peroxizomální ABC transportéry

ABC transportéry patří do skupiny membránových proteinů. Vyskytují se na plazmatické membráně a v intracelulárních prostorech, kam se řadí peroxizomy, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a lysozomy. Fungují jako zprostředkovatelé aktivního transportu u různých pochodů buňky. ABC transportéry umožňují transmembránový transport závislý na ATP pro velké množství substrátů. ABC proteiny se rozdělují na importéry a exportéry. Importéry se vyskytují u prokaryot a jejich funkce je příjem živin. Exportéry naopak umožňují sekreci toxických látek. Většina ABC transportérů u eukaryot funguje jako exportér. Skupina ABC transportérů u lidí obsahuje 49 článků, když se počítá i ABCC13, který nemá oblast ABC. Dělí dle struktury do sedmi podčeledí, kde peroxizomální jsou v podčeledi D. Do podčeledi D patří ALDP (ABCD1), ALDRP (ABCD2), ABCDM (PMP70) a ABCD4 (P70R), u kterého funkce není pořád zcela známa [21, 22, 23].



Obr 3.: Typická struktura ABC transportéru z [23].

Strukturně se transportér skládá z ABC polovičního transportéru s jednou transmembránovou doménou (TMD) a jedním nukleotid vázající doménou (NBD). Poloviční část transportéru s NH₂ je hydrofobní s šesti transmembránovými úseky a COOH část je hydrofilní s NBD. NBD, který váže ATP a dodává tak energii. Průchod pro substrát přes membrány zabezpečuje TMD. NBD se skládá ze dvou konzervativních motivů, a to

Walker A a Walker B, ty jsou odloučeny 90-120 AMK. Třetí motiv se vyskytuje proti směru od sekvence Walker B, nazývá se ABC signature [21, 23].

Strukturní specifita u zmíněných transportérů je odlišná, i když u ABCD1 a ABCD2 se částečně shoduje. Oba vymezují svou specifitu na VLCFA, i když první zmíněný tíhne spíše ke kyselině lignicerové a cerotové. Druhý má vyšší specifitnost pro kyselinu behenovou a arachovou. Právě ABCD1 transportuje VLCFA přes peroxizomální membránu, proto mutace jeho genu vede k defektu, která způsobuje hromadění VLCFA. Toto poškození se projeví jako X-ALD [21, 24, 25].

Transportér ABCD2 má vyšší afinitu k PUFA, a proto je významný na jejich přepravu. Účastní se na metabolismu mononenasyčených VLCFA, takže může být význačnější v kontrole oxidačního stresu, což se může vztahovat k oxidačním poruchám na proteinech [21].

ABCD3 je jeden z nejvíce se vyskytujících proteinů membrány. Má schopnost transportovat různé mastné kyseliny. Pro syntézu žlučových kyselin jsou velmi podstatné peroxizomy jater se silnou expresí ABCD3 [21, 22].

ABCD4 nepatří mezi peroxizomální membránové proteiny, jak je psáno výše. Spekulace o tom, zda přepravuje molekuly lipidů, které jsou významné pro jejich metabolismus, nebyly prokázány [21].

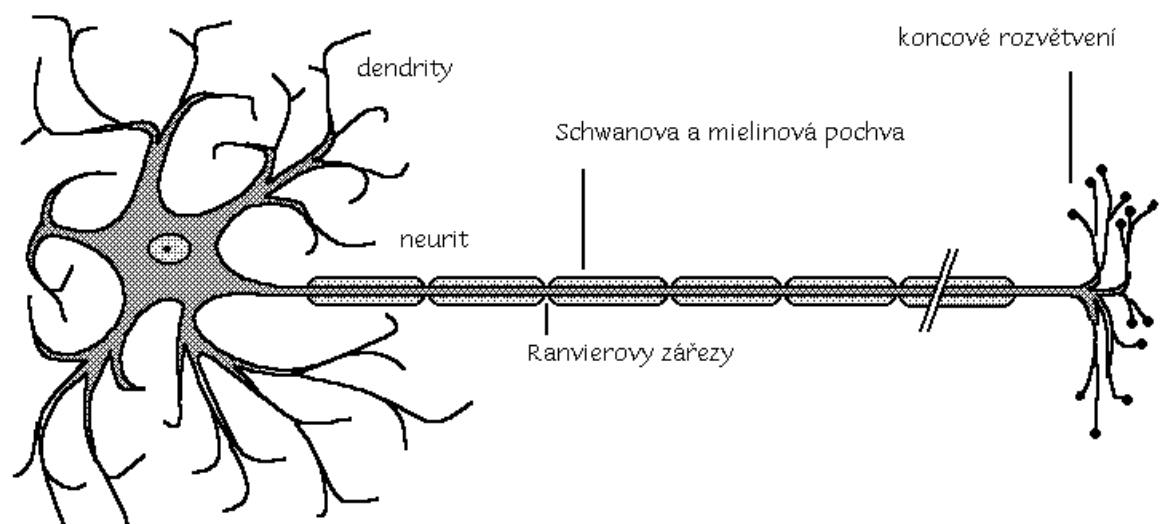
2.3 Nervový systém

Nervový systém (NS), jakožto hlavní integrační a řídicí systém organismu, ovládá jednak přímo, ale také nepřímo funkčnost jednotlivých orgánů v lidském těle. Další funkcí NS je mimo jiné také zprostředkování jednoty organismu a vzájemné interakce s vnějším prostředím. NS je zodpovědný za rychlý a především přesný přenos informací z receptorů na efektory. Podílí se na centrálním zpracování informací a vysílání nových signálů [28, 29].

Základní stavební jednotkou nervové soustavy jsou nervové buňky – neurony (viz Obr 4.), které jsou tvořeny buněčným tělem s jádrem a dlouhými výběžky, které tvoří komplexní prostorovou síť. Nervové buňky jsou vyživovány a chráněny gliovými buňkami, které s touto sítí sousedí. Neurony jsou tvořeny dvěma typy výběžků – dendrity a neurity (axony). Dendrity přijímají nervové impulsy od jiných neuronů, a tyto informace vedou do těla neuronů. Mají na svém povrchu trny, které zvětšují jejich povrch a formují postsynaptický potenciál při přechodu ze synapse na dendrit. Axony, hlavní vlákna neuronů, vedou jednak vzruchy od těla neuronů k dalším neuronům či buňkám, ale také přepravují látky z těla buňky do distální části axonu. Axonový hrbol je důležitý pro vznik vzruchu

v neuronu a dochází zde k odstupu axonu. Axon je dále v iniciálním segmentu obnažen a postupně dochází ke vzniku Schwannovy buňky a myelinové pochvy, tvořené z myelinu. Myelinová pochva napomáhá k rychlejšímu šíření nervových impulsů a brání k jejich zeslabení popř. úplnému vytracení. V místech ztenčení myelinové pochvy jsou Ranvierovy zářezy – nodia, které se také podílí na rychlejším pohybu akčního potenciálu po nervovém vláknu. Čím je vzdálenost mezi jednotlivými zářezy delší, tím je vlákno silnější a tím jsou vzruchy vedeny rychleji [28, 29].

Další podstatnou částí je hematoencefalická bariéra, oddělující mozkovou tkáň a od krevního oběhu, která chrání CNS před prostupem toxických látek z krve do mozku, dále udržuje a kontroluje stálé vnitřní prostředí CNS [28]. Mezibuněčné prostory v CNS zajišťují přívod živin a následný odvod katabolitů. Přenos látek je jak anterográdně, tak retrográdně. Jelikož se jedná o aktivní děj, je potřeba oxidační fosforylace, ATP a příhodná koncentrace vápenatých iontů [28, 29].



Obr 4.: Schéma neuronu z [5].

2.3.1 Myelin

Myelin je lipoproteinový komplex tvořený velkým množstvím bílkovinných a lipidních látek (cholesterol, sfingomyeliny, fosfolipidy, cerebrosidy) a obsahuje velmi málo vody, díky tomu však tvoří izolační vrstvu kolem axonů a umožňuje velmi rychlé vedení vzruchu po nervových vláknech. Myelin je v CNS složen ze specifických buněk – oligodendrocyty a gliové buňky, avšak v periferní nervové soustavě (PNS) je tvořen buňkami Schwannovými.

Myelinizace je proces tvorby myelinových pochv okolo nervových vláken. Tento proces začíná již ve 20. týdnu prenatalního vývoje a je velmi důležitý pro správnou funkčnost CNS a PNS. Patologie v tvorbě myelinu vede ke vzniku neurologických onemocnění – leukodystrofie [29, 30, 31].

Demyelinizace je naopak děj, kdy dochází k poškození, úbytku nebo úplnému odstranění myelinu. Demyelinizaci může způsobit velké množství faktorů, které jsou často spjaty s patologickými abnormalitami, které vedou k narušení funkce a také struktury myelinové pochvy. Příkladem může být myelin bazický protein (MBP), který se účastní destrukce myelinu, dále také protilátky (Ab) namířené proti myelinovým antigenům (Ag) či cytokiny – interleukin 1 (IL – 1), interleukin 12 (IL – 12), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF – α) a interferon gama (INF – γ). Demyelinizované axony jsou neschopné vést vzruch saltatorně, proto je vedení vzruchu pomalé. Demyelinizační procesy mohou vést k roztroušené skleróze, k defektům funkce neuronů, které má za následek narušení signálu mezi mozkiem a jinými částmi těla. Nejčastějšími klinickými projevy bývají poruchy zraku, únava, hučení v uších [30, 32].

Remyelinizace je proces vedoucí k obnově myelinu. Tento děj je způsoben progenitorovými buňkami oligodendrocytů, které v místě léze vytvářejí nové myelinové pochvy, tím že vytvoří pouzdro okolo demyelinizovaných axonů. Remyelinizace není plnohodnotný proces, z počátku se jedná o aktivní děj, avšak s progresí onemocnění bývá tento děj neúčinný.

Organizace založená v roce 1989 Augustem a Michaelou Lorenzo se zabývá hledáním léku na myelinovou nemoc a to v rámci vědeckého výzkumu *The Myelin Project*. Poskytli tak pomoc rodinám, u kterých si vyskytla adrenoleukodystrofie (ALD) a adrenomyeloneuropatie (AMN). Jejich dalším cílem bylo informovat a dostat do podvědomí lidí tato onemocnění a prosadit novorozenecký screening na ALD a AMN. Nyní je léčba navržena tak, že spočívá v chirurgické implantaci prekursorových buněk oligodendrocytů a tím navození myelinu pomocí Ab. Tento postup již byl testován u myši, u lidí není však účinek prokázáný [33, 34, 35, 36].

2.4 Leukodystrofie

Leukodystrofie je značně různorodá skupina genetických defektů, které působí na CNS, protože inhibují růst a zachování myelinové pochvy. K poruše myelinu dochází procesem demyelinizace nebo dysmyelinizace. Označuje to tedy skupinu chorob, které ovlivňují bílou

hmotu NS. Všechny typy onemocnění jsou analyzovány, a to mechanismem dědičného přenosu, enzymovým metabolickým defektem a genomovou lokalizací [37, 38, 39, 40].

Pro zachování myelinové pochvy a jejího rozvoje se uplatňuje mnoho typů genů. Geny jsou nutné pro syntézu proteinů a další pro přepravu proteinů na konečné místo v myelinové pochvě. Mutací genu vzniká leukodystrofie, u které se symptomy odlišují podle typu jejich genové příčiny. Leukodystrofie může mít různé způsoby přenosu genů (autosomálně dominantní, autosomálně recesivní, nebo X-vázaná [38]).

Leukodystrofie vykazují mnoho společných symptomů. Vyskytují se paretické projevy centrálního typu se spasticitou, ale také mozečkové symptomy, periferní parézy vzácně i dyskinetické projevy. Časem se mohou dostavit poruchy chování kognitivních funkcí, objevují se epileptické záchvaty a poruchy zraku, sluchu. Defekty u myelinizace pomáhají diagnostikovat enzymová vyšetření, vyšetření multimodálních evokovaných potenciálů, magnetická rezonance a genová analýza [37,39].

Společné znaky roztroušené sklerózy a leukodystrofie jsou ztráta myelinu a axonu. Tyto dvě nemoci patří mezi autoimunitní onemocnění [38, 41, 42, 43].

Nemoci, které sem patří jsou Pelizaeusova-Merzbacherova choroba, Alexandrova choroba, Krabbeho choroba, Canavanova choroba metachromatická leukodystrofie a peroxizomální leukodystrofie [37, 39, 44, 45].

2.4.1 Peroxizomální leukodystrofie a další peroxizomální defekty

Peroxisomy jsou buněčné orgány, ve kterých se vyskytují enzymy a ty se účastní mnoha důležitých anabolických i katabolických buněčných mechanismů. Označení je odvozeno od přítomnosti katalázy, což je enzym, který katalyzuje změnu peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Peroxisomy se nalézají ve všech lidských buňkách vyjma erytrocytů. Mají významnou funkci v biotransformaci endogenních látek metabolismu lipidů, ke kterým řadíme např.: mastné kyseliny, prostaglandiny, steroidy. Účastní se také na detoxikaci exogenních látek. Peroxisomy umí katalyzovat početnou skupinu lipidů, jako jsou LCFA, VLCFA, nenasycených MK, diethylether fosfolipidy či žlučové kyseliny. Základní drahou odbourávání pro lipidy v peroxizomech je β -oxidace. Degradční podíl peroxizomů také nechybí u oxidace kyseliny fytanové, žlučových kyselin nebo derivátu chlorofylu. Mají funkci i při tvorbě myelinu neuronů.

Peroxisomální poruchy patří mezi skupinu dědičných onemocnění a dělí se na skupiny, a to defekty peroxizomální biogeneze a na jednotlivé deficity enzymů peroxizomů [48, 49].

Biogeneze peroxizomů je v mnoha ohledech podobná biogenezi mitochondrií, obě se množí dělením preexistujících peroxizomů. Odlišné od mitochondrií je, že nemají svou vlastní DNA a jejich proteiny jsou kódovány jaderným genomem. Peroxizomální proteiny se vytváří na volných polyribosomech a jsou transportovány do peroxizomů díky PTS-receptory, které kódují geny PEX. K poruchám peroxizomální biogeneze se řadí Zellwegerův syndrom, infantilní Refsumova choroba, neonatální adrenoleukodystrofie a Rhizomelická chondrodysplasia punctata typ I. [48, 50, 51].

Peroxisomy katalyzují mnoho podstatných metabolických mechanismů. Z pohledu deficitu enzymů peroxizomů jsou významné β -oxidace mastných kyselin, α -oxidace mastných kyselin, biosyntéza esterfosfolipidů a detoxikace glyoxylátu. Defekty v peroxizomální β -oxidaci MK se vyskytují u X-vázané adrenoleukodystrofie (X-ALD), deficitu acyl-CoA oxidázy, deficitu D-bifunkčního proteinu (D-BP) a ztrátě 2-methylacyl-CoA racemázy. U X-ALD je poškozena peroxizomální β -oxidace VLCFA. U deficitu D-bifunkčního proteinu je narušena oxidace všech peroxizomálních MK, jelikož D-BP představuje enzymatický protein, jenž se účastní oxidaci všech MK. Porušená oxidace VLCFA s nepoškozenou oxidací kyseliny pristanové, DHCA a THCA se vyskytuje u ztráty acyl-CoA oxidázy. U schodku 2-methylacyl-CoA racemázy je vadná pouze peroxizomální β -oxidace větvených MK (kyseliny pristanové, DHCA a THCA). Biosyntéza esterfosfolipidů (plazmalogenů) je poškozena u deficitu DHAPAT a ztrátě alkyl-DHAP syntézy. Defekt α -oxidace mastných kyselin se nachází u Refsumovy choroby, kde se objevuje nedostatek fytanoyl-CoA hydroxylázy. Při ztrátě detoxikace glyoxylátu, která se nazývá hyperoxalurie typ 1, je porušen peroxizomální enzym alaninglyoxylátaminotransferáza, následně dochází k akumulaci glyoxylátu, jenž je poté transformován na glykolát a oxalát [48, 49, 52].

2.4.1.1 Diagnostika peroxizomálních poruch

V diagnostice se nejčastěji využívají jak prenatalní, tak postnatalní metody. Při prenatalní diagnostice se využívá histochemických nebo imunocytochemických metod. V rámci cytochemických technik se v choriových klcích vizualizuje kataláza a plazmalogeny. Při chorobách s poruchou biogeneze peroxizomů se v klcích neobjevují tmavé granule a test na přítomnost plazmalogenů je negativní. Deficit peroxizomálních enzymů se v následujících stádiích gravidity stanovuje v amniových buňkách. Pro vysokou citlivost se s oblibou využívají metody, které používají značené protilátky proti peroxizomálním enzymům, jako jsou anti-kataláza či anti-thioláza atd. Imunofluorescenční techniky jsou příhodné pro prokázání více defektů [48, 53].

V postnatální diagnostice se využívají histochemické metody s použitím DAB, který reaguje s peroxizomálním enzymem katalázou [48, 53].

Postnatální diagnostiku peroxizomálních chorob, lze rozdělit do několika diagnostických kategorií. První diagnostická skupina obsahuje Zellwegerovské spektrum poruch (ZS, NALD, IRD) či deficit acyl-CoA oxidázy a deficit D-bifunkčního proteinu. Druhá skupina zahrnuje spektrum rhizomelické chondrodysplasia punctata, které má všechny tři typy. Do třetí skupiny patří X-vázaná adrenoleukodystrofie a do čtvrté se spadají zbylé peroxizomální poruchy, jako je Refsumova choroba, deficit 2-methylacyl-CoA racemázy či hyperoxalurie typu 1 a další [48].

U defektů v první diagnostické skupině jsou patologické hladiny VLCFA v séru, především vyšší nález hladin VLCFA (C24:0, C26:0, C26:1, poměr C26:0/C22:0 a C24:0/C22:0). Provádí se další vyšetření, když se potvrdí zvýšení, které usnadní rozlišení jednotlivých chorob. K vyšetřením patří analýza plazmalogenů v erytrocytech, stanovení intermediátů žlučových kyselin, kyseliny pristanové a fytanové v plazmě. Nižší hladina plazmalogenů v erytrocytech poukazuje na Zellwegerovské spektrum, normální hladiny zpravidla bývají u poruch peroxizomální β -oxidace. Následně by měly být vypracovány studie na fibroblastech, které poukáží na poruchu biogeneze či izolovanou poruchu β -oxidace. U Zellwegerovského spektra se také vyšetřuje mutovaný gen [48, 53].

Rhizomelická chondrodysplasia punctata typu 1, 2 i 3 jsou si klinicky velmi podobné, což ulehčuje jejich zařazení do jedné diagnostické skupiny (II. diagnostická skupina). U všech typů jsou nižší hladiny plazmalogenů v erytrocytech. Ke klasifikaci jednotlivých typů se opět používají studie na fibroblastech [48].

U třetí diagnostické skupiny, kam patří X-vázanou adrenoleukodystrofií, se provádí analýza VLCFA v plazmě. Diagnostika X-vázané adrenoleukodystrofie bude podrobně popsána v kapitole 3.5.6 [48, 53].

U Refsumovy choroby se objevují patologické hladiny kyseliny fytanové v plazmě. Pro finální diagnózu se stanovuje také aktivita fytanoyl-CoA hydrolázy ve fibroblastech a dělá se molekulární analýza [48, 52].

Lidé s deficitem 2-methylacyl-CoA racemázy nedokážou rozkládat kyselinu pristanovou a intermediáty žlučových kyselin. Díky tomu se v plazmě analyzuje kyselina pristanová pomocí GC-MS a intermediáty žlučových kyselin metodou MS/MS [48, 53].

Pro primární hyperoxalurie typu 1 je typické vyšší hladina glyoxylátu, oxalátu a glykolátu v moči. Ke konečnému určení této nemoci se používá molekulární analýza genu AGT [48].

2.5 Adrenoleukodystrofie

X-vázaná adrenoleukodystrofie představuje nejčastěji se vyskytující peroxizomální onemocnění, které patří pod leukodystrofie. X-ALD je charakterizována jako recesivní X-chromozomálně vázaná porucha lipidového metabolismu, která se projevuje neurologickou symptomatologií a insuficiencí nadledvin. Mutace v genu ABCD1 ovlivňuje funkci proteinu ALDP. Nedostatek ALDP poškozuje peroxizomální β -oxidaci VLCFA a usnadňuje jejich další prodlužování řetězce (ELOVL1), což má za následek kumulaci VLCFA (především C26:0) v plazmě a tkáních. Kvůli lokalizaci genu ABCD1 na Xq28 se toto onemocnění objevuje pouze u mužů, ale mírnější formy se objevují i u žen. Jiné klinické názvy pro X-vázanou adrenoleukodystrofii zní Schilderova choroba a sudanofilní leukodystrofie [38, 39, 54, 55, 56].

2.5.1 Výskyt nemoci

Projevy nemoci jsou hlavně u mužů. Výskyt X-ALD je 1:15 000 (Francie) až 1:21 000 (USA) postižených mužů a prevalence je 0,5-3,3 na 100 000 mužů. Kvůli početné incidenci představuje nejběžnější celosvětovou peroxizomální poruchu. Na Slovensku i v České republice jsou ročně zaznamenány přibližně jeden až dva případy. Skutečná incidence nemoci může být i vyšší, protože se novorozenecký screening doposud všude neprovádí [56, 58, 65].

2.5.2 Klinické formy

Adrenoleukodystrofie má několik různých projevů fenotypu, i když není souvislost mezi typem mutace a fenotypem. Dokonce při stejné mutaci v rámci jedné rodiny může být různá manifestace nemoci. Fenotypy jsou rozděleny podle věk, kdy nemoc propukla, také podle zasažených orgánů a neurologické progresy. V odborné literatuře je uvedeno sedm fenotypů u mužů a pět u žen [56, 59].

Jeden z nejhojnějších (30-40%) a nejzávažnějších forem ALD je dětská cerebrální. Choroba začíná stupňovat po uplynutí asymptomatického období, nejdéle v deseti letech pacienta. Tuto formu provází deficit neurologických, kognitivních a behaviorálních funkcí. Četnými průvodními příznaky jsou emoční labilita, hyperaktivita, zhoršení se ve škole, změny v chování, zhoršení paměti. Progrese nemoci po vyskytnutí prvních příznaků je velmi rychlá. V pozdějším období se mohou dostavit známky demence a epileptické ataky. Během několika týdnů nemocní chlapci přestanou rozumět jazyku a chodit. V terminálním stádiu nemoci jsou

chlapci nehybní, nemohou mluvit ani reagovat, jsou slepí a potravu přijímají nazogastrickou trubicou. Smrt přichází po dvou až čtyřech letech od prvních symptomů, v případě, že je o pacienta dobře pečováno, může až několik let zůstat ve vegetativním stavu [56, 58, 59, 60, 61].

Adolescentní cerebrální forma postihuje asi 5 % pacientů ALD. První klinické příznaky přicházejí mezi jedenácti až jednadvaceti lety. Projevy této nemoci jsou podobné jako u dětské cerebrální formy, pouze rychlost progresu onemocnění je menší [56, 58].

Adultní cerebrální forma se také vyskytuje přibližně u 5 % případů ALD. Symptomy onemocnění se manifestují zpravidla až po dvacátém roce života. Klinické projevy a stupňování jsou rovněž obdobné jako dětská cerebrální forma. V iniciálním stádiu nemoci se objevují psychické poruchy, jako je schizofrenie nebo psychóza. Z tohoto důvodu jsou pacienti mockrát špatně diagnostikováni. Manické příznaky zahrnují impulzivnost, nadměrnou sexualitu, zvýšené utrácení peněz či hlučnost [56, 58, 59].

Addisonova forma shrnuje pouze projevy renální nedostatečnosti s minimálními neurologickými rysy. Touto formou trpí asi 10 % nemocných s ALD. U pacientů s Addisonovou formou se může s velkým nebezpečím rozvinout AMN. Její výskyt se redukuje s přibývajícím věkem, běžně se vyskytuje do čtyř let a velmi vzácně po čtyřicátém roce. Adrenokortikální insuficience nejprve napadá glukokortikoidní funkci nadledvinek, avšak i mineralokortikoidní funkce je nakonec také postižena asi u půlky pacientů s ALD [56, 58, 59, 62].

Asymptomatická forma se vyskytuje u nemocných, kteří sice mají velmi vysoké hladiny VLCFA, ale neobjevuje se u nich insuficience nadledvinek, ani neurologické potíže. Avšak tito pacienti mají vysoké riziko rozmachu těchto komplikací. Asymptomatictí pacienti se objevují velmi zřídka [56, 59].

Olivo-ponto-cerebrální forma je provázena postižením mozečku a mozkového kmene. Může se vyskytovat u dospívajících či dospělých osob. Rovněž jako asymptomatická forma je velice neobvyklá [56, 63].

Adrenomyeloneuropatie (AMN) představuje nejčastější podobu ALD. Její výskyt je okolo 40 až 45 % případů ALD. Choroba se začíná projevovat mezi třicátým až čtyřicátým rokem. Zasažena je mícha, periferní nervy a nadledvinky. Původní příznaky jsou ztuhlost, slabost nohou a poruchy sfinkterů. Poté se rozvíjí spastická paraparéza, neuropatie, impotence, insuficience kůry nadledvin atd. AMN je mnohdy nesprávně diagnostikována jako roztroušená skleróza nebo familiární spastická paraparéza. U této formy se vyskytuje i Addisonova nemoc, která se projevuje komplexní slabostí, poklesem hmotnosti, nevolností

a zvracením. Symptomy adrenální insuficience mohou předcházet neurologickým příznakům asi u 40 % nemocných. Dále se u nemocných objevuje hyperpigmentace a porucha zraku či sluchu. AMN je pozvolna progresivní [56, 58, 59, 62].

U žen přenašeček ALD se mohou symptomy projevit později, přibližně u 50 % žen se vyskytují po čtyřicátém roce života, přičemž neurologickými poruchami trpí méně než půlka postižených žen. Klinické projevy jsou umírněnější, progresse je pomalejší a u 20 % heterozygotek se příznaky podobají AMN [56, 59, 64].

2.5.3 Genetický podtext

X-vázaná adrenoleukodystrofie se manifestuje u mužů. Jak už ukazuje z název, řadí se mezi dědičnosti vázané na chromozom X. Nicméně i přes X-recesivní dědičnost se mírnější formy mohou projevit i u žen. Jedná se o gonozomálně recesivní typ dědičnosti (X-vázaná dědičnost podobně jako hemofilie), takže jestli je žena přenašečkou X-ALD, bude polovina jejich dcer přenašečkami nemoci a polovina jejich synů bude trpět X-ALD. V další generaci dcery postiženého muže budou přenašečky, ale žádný z jeho synů nebude trpět nemocí X-ALD [54, 56].

X-ALD gen (ABCD1) byl identifikován za použití metody pozičního klonování. Gen je lokalizován na chromozomu X, konkrétně na Xq28, blízko od genu pro glukozu-6-P-dehydrogenázu a genového souboru pro vizuální pigmenty. ABCD1 gen je asi 19,9 kb dlouhý, je sestaven z deseti exonů, které jsou transkribovány ve formě 4,3 kb velké mRNA. Gen ABCD1 kóduje ALDP, který obsahuje 745 aminokyselin. ALDP je ABC transportér z podčeledi D a buď jako homodimer nebo heterodimer zprostředkovává pohyb VLCFA přes peroxizomovou membránu. Transportovány jsou jako volné kyseliny, či jako CoA estery. Existují i domněnky, že ALDP hraje i určitou úlohu v transportu enzymu VLCS do peroxizomů [56, 57, 66, 67, 68].

U všech pacientů s X-ALD byla nalezena mutace X-ALD genu, která způsobuje defekt ALD proteinu. Díky mutaci genu se stává deficitní funkce ALDP, čímž se redukuje kapacita syntézy CoA esterů VLCFA a jejich následující β -oxidace v peroxizomech. Výsledkem zpomalení těchto mechanismů dochází ke kumulaci VLCFA, což vede k vážným patobiochemickým následkům a morfologickým změnám [56, 57, 66].

Do dnešní doby bylo zaregistrováno okolo 866 případů mutací zapříčiňujících X-ALD, přičemž 435 mutací je unikátních. Databáze veškerých dosud zachycených mutací je zveřejněna na webové stránce www.x-ald.nl. K nejobvyklejším mutacím se zařazují mutace

měníci smysl, nesmyslné mutace (non-sense mutation), posunové mutace, jako jsou delece a inserce. Až 75 % mutací zapříčiní, že protein nelze v buňkách dostupnými metodami rozpoznat. V ČR je v současnosti zaznamenáno pět rodin, u kterých alespoň jeden z rodiny onemocněl X-ALD. U těchto pacientů byla diagnóza prokázána nálezem mutace v ABCD1 genu pomocí sekvenční analýzy [56, 67, 68].

2.5.4 Patogeneze

Jak už bylo napsáno, kvůli mutaci genu ABCD1 mají pacienti s X-ALD sníženou schopnost degradovat mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, čímž se poškodí funkce ALDP. Výsledkem nedostatku ALDP je poškozena VLCFA β -oxidace a dochází k hromadění VLCFA-CoA (C24:0, C26:0) esterů v různých tkáních a tělních tekutinách. VLCF acyl-CoA estery se v cytosolu začleňují do odlišných lipidových frakcí, navíc jsou výchozí částí pro prodloužení, aby mohly vzniknout delší mastné kyseliny. Zodpovědná za prodloužení je ELOVL1, která jako jediná elongáza katalyzuje syntézu nasycených VLCFA (C26:0) i mononenasycených VLCFA (C26:1). Některé studie prokazují, že akumulace VLCFA je toxická. Podle těchto prací má hromadění VLCFA toxický účinek na různé buněčné tkáně, jež jsou u pacientů s X-ALD změněny. Je tomu i v případě oligodendrocytů, které obstarávají tvorbu myelinu v mozku, a adrenokortikotropních buněk, jež mají podíl na výrobě kortikotropinu v nadledvinkách. Zvýšené VLCFA mohou podnítit destabilizaci struktury a funkce membrány i buněčných organel (mitochondrie, lysozomy), což vede ke zrodu oxidačního stresu škodlivého pro buňky [55, 58, 66, 69, 70].

Volné radikály zřejmě hrají podstatnou úlohu u velkého množství onemocnění. Existují důkazy poukazující, že poškození vlivem volných radikálů je jedním z nejdůležitějších činitelů u neurodegenerativních či chronických zánětlivých onemocnění. Mozek má poměrně malou antioxidační obranu a vysoký obsah lipidů s velkým množstvím nenasycených mastných kyselin a katecholaminů, které jsou velmi senzibilní na kyslíkový útok. V klinické studii bylo zjištěno značné zvýšení plazmy, což reflektuje navození peroxidace lipidů, a také úbytek celkové plazmové antioxidační reaktivity. Dále byl odhalen velký vzrůst glutathion peroxidázy v erytrocytech, katalasy či superoxidodismutázy ve fibroblastech sledovaných pacientů. Z této příčiny se oxidační stres může podílet na patofyziologii X-ALD. Dle nových studií, v boji proti oxidačnímu stresu u X-ALD se dá využít kyselina valproová, která indukuje expresi ABCD2 peroxizomálního transportéru. Kyselina valproová následně opravuje oxidační defekt a snížení hladiny mononenasycené VLCFA (C26:1), ale nezmenšuje

počet nasycených VLCFA. Kyselina valproová je zatím ve fázi testování, ale jeví se jako slibný terapeutický přístup [71, 72, 73].

U dětské i adolescentní cerebrální formy se uplatňují stejné mechanismy, jak neschopnost degradovat VLCFA, tak začlenění VLCFA do různých skupin lipidů. Dále v patogenezi X-ALD hrají roli i počáteční mozková demyelinizace, sporadická konverze na rychlou progresivní zánětlivou demyelinizaci, zprostředkovaná konverze z čistého AMN na rychlou progresivní zánětlivou demyelinizaci či neschopnost zachytit zánět vnitřních mechanismů. Začátek mozkové demyelinizace může souviset s množstvím VLCFA v komplexních lipidech (sulfatidy, fosfatidylcholiny, gangliosidy). Demyelinizace běžně začíná ve středu *corpus callosum*, kde jsou svazky bílé hmoty nejvíce zhutnělé, a rozšiřuje se dále směrem ven do periventrikulární bílé hmoty. Nejčastějšími útvary degradace myelinu a oligodendrocytů jsou lymfocyty, reaktivní astrocyty a makrofágy. Lymfocyty byly pozorovány spíše na okraji, astrocyty a makrofágy byly nalezeny v morfoloicky normální či mírně ovlivněné přilehlé bílé hmotě. Neurologické poruchy u X-ALD mohou být zapříčiněny aktivací astrocytů a cytokinů (TNF, IL-1, IL-6).

ALDP se nachází jen v kůře nadledvin, nikdy ne ve dřeni nadledvin. Patologické poznatky lamel a lamelových lipidových profilů ukázaly, že obsahují VLCFA, které se esterifikují na cholesterol v adrenokortikotropních buňkách a vedou k apoptóze buněk.

U X-ALD dochází také k transformacím v rámci varlat a vlasů nemocného. V intersticiálních buňkách varlat jsou přítomny lamelové lipidové profily esterů VLCFA-cholesterolu. Navíc může dojít ke schodku některých Leydigových buněk. Následkem toho může mít určitý úsek pacientů nižší sexuální funkci. Vlasy u pacientů s AMN bývají slabé a řídké, protože za normálních okolností je ABCD1 exprimován ve vlasovém váčku [54, 59, 69, 74].

2.5.5 Diagnostika

Přesná diagnostika je nezbytná, neboť je příliš velká rozdílnost klinický fenotypů. X-ALD. Je velice podstatné stanovit nejen pacienty, ale i heterozygotní nosiče. Pro diagnostiku X-ALD jsou významné zobrazovací techniky, neurofyziologické a neuropsychologické vyšetření, imunologické rozbor, biochemická a molekulárně-genetická vyšetření. K nejvíce používaným zobrazovacím technikám patří CT a MR, kdy MR je více citlivá. K prozkoumání se využívá zrakových, sluchových a somatosenzorických evokovaných potenciálů. K diagnostickým metodám dále patří elektroencefalografie a elektromyografie. Indikátorem progresu ALD je stoupající intratekální syntéza imunoglobulinu G. Biochemické vyšetření je

založeno na detekci kumulace VLCFA v tělních tekutinách. Koncentrace VLCFA se zjišťuje v plazmě nebo séru, kde se prokazují převážně zvýšené hodnoty kyseliny behenové (C22:0), lignocerové (C24:0), cerotové (C26:0) a poměry C26:0/C22:0 a C24:0/C22:0. Do molekulárně-genetické diagnostiky se řadí sekvenční analýza všech exonů ABCD1 genu [39, 56, 75, 76].

2.5.5.1 Zobrazovací metody

Zobrazovací techniky jsou důležité pro diagnostiku, zhodnocení výsledků léčby, stanovení prognózy onemocnění a léčbu. Magnetická rezonance charakterizuje velikost demyelinizace. Na základě získaných dat z MR jsou určeni kandidáti na transplantaci kostní dřeně. Typické symetrické léze v periventrikulární bílé hmotě v perietálních a okcipitálních lalocích jsou detekovány MR. Bilaterální hypodenzní léze odhalí nativní CT taktéž v těchto oblastech. Při T2 vážení v MR obraze jsou léze hyperintenzitní. Používá se kontrastní látka (gadolinium), látka se hromadí před hypodenzními lézemi v T1 vážení, což koreluje s histopatologickými oblastmi demyelinizace s parciální ztrátou myelinu. AMN má obdobné nálezy jako dětská forma, ale defekty mohou být v *capsula interna*, *corpus callosum*, *corona radiata* či v mozečkovém *pedunkulu*. Používá se i speciální technika MR, která se nazývá Diffusion Tensor Imaging, která ukazuje změny signálu způsobené difuzí molekul vody ve tkáních. Touto technikou získáme mapu v mozku, kde směry difuze představují rozdílné barvy [56, 77, 78, 79, 80, 81].

2.5.5.2 Biochemické vyšetření

Biochemická diagnostika VLCFA se nejvíce provádí prostřednictvím plynové chromatografie nebo spojením plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Detekce VLCFA pomocí HPLC by mohla být významná, neboť je využívána a dostupná v běžných analytických laboratořích. Dále se může použít metoda UPLC-MS/MS, která je rychlá a specifická. Oproti tomu je GC-MS pracnější a časově náročnější. Biochemická vyšetření VLCFA v plazmě je doposud nejvíce používanou analýzou pro X-ALD [66, 82, 83]. Nahromaděná VLCFA se vyskytuje ve frakci esteru cholesterolu kůry nadledvinek a v bílé hmotě mozku. Akumulují se MK s délkou uhlíkatého řetězce přibližně mezi 22 až 32 uhlíků, ale častokrát jde o 24 a 26 uhlíků dlouhý řetězec. V kultivovaných fibroblastech je také prokázána vyšší hladina VLCFA. Zvýšená koncentrace MK se vyskytuje jak v plazmě pacientů, tak i nosičů [84, 85].

Do zkumavek s heparinem se pro vyšetření odebírá žilní krev, z které je oddělena plazma, ta je zmrazena. Vzniklé a upravené methylestery MK se analyzují GC-MS [56, 85].

U techniky LC-MS/MS je příprava vzorku velmi obdobná jako u GC-MS. Znovu se vzorky žilní krve odebírají do heparinizovaných zkumavek. Pro porovnání se použil Bland-Altman graf, který ukázal, že výsledky obou metod jsou srovnatelné a patří do klinicky přijatelného 95 % limitu [83, 86].

2.5.5.3 Molekulárně-genetické metody

Diagnostika zahrnuje sekvenční analýzu všech exonů ABCD1 genu. Používá se i PCR a RFPL, ale především je už známá mutace. SSCP a dHPLC jsou screeningové metody, ty umí zobrazit mutovanou část genu. Nejvýhodnější pro diagnostiku DNA je, když se informace z mRNA prostřednictvím reverzní transkriptázy přepíše do opisu cDNA [56, 87].

Vyšetření heterozygotů je složité, protože u určité skupiny byly zjištěny normální koncentrace VLCFA v plazmě, a tak se navrhuje molekulární studie. Nejčastěji se využívá imunofluorescence, kde se používají protilátky proti ALD proteinu, ale jen, když je vyloučena rodinná anamnéza. Výsledek této metody může tvořit nestabilní protein, díky čemuž je detekován mozaikový nálezn u heterozygotů [48, 75].

2.5.5.4 Prenatální diagnostika a novorozenecký screening

Primárně pro diagnostiku X-ADL se využívá prenatální vyšetření, kde se detekuje Y chromozom v maternální krvi, což určuje pohlaví plodu. Po určení mužského pohlaví dojde k biopsii choriových klků, kde se odhaluje ALD protein a mutace ABCD1 genu [48, 59].

Praktikování novorozeneckého screeningu přineslo velký rozvoj v časně diagnostice u spousty vzácných dědičných metabolických poruch. Pro novorozenecký screening se na kartičku ze speciálního filtračního papíru nanese krevní skvrna. Karta se analyzuje spektrometrickými technikami. Pro nedostatečnou citlivost se nyní využívá spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), která funguje na principu stanovení C26:0 lysofosfatidylcholinu (26:0-lyso-PC) ve skvrně krve. Hodota 26:0-lyso-PC u pacientů s X-ALD je až pětkrát vyšší, než koncentrace u zdravých osob. Tato metoda má vysoký potenciál, díky své dostupnosti a pacient může začít terapii už v den svého narození [88, 89, 90, 91].

2.5.6 Terapie

Terapie X-ALD je v této době pořád výrazně limitovaná. Léčbu lze klasifikovat na dietetickou, farmakoterapeutickou, imunosupresivní, buněčnou transplantaci a genovou terapii. Nelze jednoduše stanovit způsob léčení pro různé formy X-ALD. Prokazatelně nejlepší možnost terapie je transplantace kostní dřeně a hematopoetických kmenových buněk [56, 57, 92].

Dietní forma léčby je založena na nízkém příjmu stravy s vysokou hladinou VLCFA a na pravidelném užívání Lorenzova oleje, což je směs nenasycených MK. Při konzumování Lorenzova oleje se pravidelně vyšetřuje krevní obraz, z důvodu hrozby trombocytopenie. Tato možnost terapie se používá u pacientů bez symptomů, nebo pokud jsou mírné [57, 92, 93].

U farmakoterapeutické možnosti léčby se podávají léčiva, která zajišťují zvýšenou oxidaci VLCFA a regulují změny v patobiochemii lipidových frakcích.

Experimentálně se testoval lovastatin, protože by mohl zvyšovat oxidaci C24:0 v kultivovaných X-ALD buňkách a zároveň snižovat koncentraci VLCFA v plazmě. Po důkladném prošetření se ukázalo, že lovastatin zajišťuje lehký pokles C24:0 a C26:0 v plazmě nemocných, nemá žádný účinek, a proto se nepoužívá jako lék [94, 95, 96]. Fenylobutyrát a fenylacetát se řadí mezi léčiva, protože zvyšují peroxizomální proliferaci. Tyto přípravky nejsou dostatečně testovány, ale podle hypotéz zvyšují expresi ABCD2 genu a oxidaci VLCFA [92, 94, 97].

Cílem imunosuprese je likvidace zánětlivých pochodů v mozku, jež zapříčiňují demyelinizaci. Imunosuprese se zavádí hlavně u forem s vysokou progresivitou. Mezi terapeutické látky patří β -interferon, cyklofosfamid, cyklosporin, pentoxyfyllin či thalidomid. [57, 92, 94].

Nejvíce účinnou terapií je výhledově transplantace buněk kostní dřeně (HSCT). Pokud se podaří provést transplantaci v iniciační fázi onemocnění, je vysoká šance na dlouhý a kvalitní život [98, 99, 100, 101].

Pro genovou terapii jsou pacienti s X-ALD výraznými kandidáty, protože terapie s lentivirovými vektory má srovnatelnou účinnost jako HSCT. Genová terapie se poprvé využila, když se pro dva nemocné chlapce našel HLA odpovídající dárci. Do periferních CD34+ buněk se transformoval neporušený ABCD1 gen prostřednictvím lentivirového vektoru. Transformované buňky se implantovaly zpět pacientovi. U této metody je výhoda, že se eliminovala úmrtnost spojená s alogenní HSCT [57, 101, 102, 103].

Pro léčbu diabetu byl vyvinut lék Pioglitazon, ale experimentálně se prokázalo, že by mohl chránit nervové buňky a zpomalit progresy X-ALD [104, 105].

2.5.6.1 Lorenzův olej

Lorenzův olej se skládá z kyseliny olejové a kyseliny erukové v poměru 4:1, které jsou extrahovány z řepkového a olivového oleje. Olej zpomaluje progresi nemoci tím, že brání akumulaci VLCFA v mozku. Lorenzův olej je speciálně vyrobený jen pro X-ALD, kde pacienti musí splňovat dvě kritéria: fyziologická MR a vysoká koncentrace VLCFA. Olej funguje na principu kompetitivní inhibice enzymu, který katalyzuje vznik C26:0 [31, 92, 100, 106]

Objeviteli Lorenzova oleje jsou Augusto a Michael Odone. Výzkumem se zabývali z důvodu onemocnění syna Lorenza, který trpěl X-ALD. U syna se objevily první symptomy kolem šesti let, kdy došlo ke změnám chování (snížená pozornost, agresivita, zhoršená paměť). Po správném určení diagnózy, rodiče hledali možnost léčby. Po letech studií se jim podařilo zhotovit Lorenzův olej, který synovi velmi pomohl. K úplnému vyléčení však nedošlo z důvodu pozdní aplikace oleje. Od roku 1989 se prováděla studie ohledně terapeutických účinků Lorenzova oleje. O třináct let později došlo k uznání efektivity tohoto léku [31, 107, 108].

2.5.7 Prognóza

Prognóza X-ALD je velmi nepříznivá. Od vyskytnutí se prvních příznaků nemoci nastává mortalita nejdéle do deseti let. Ke snížení úmrtnosti pomáhá včasná identifikace přenašeček a genetická prevence. Transplantace kostní dřeně, což je léčba s nejvyšší účinností, je indikována při včasné diagnostice. Tato jediná metoda dokáže zpomalit progresi nemoci. Vědci doufají, že genová terapie po řádném zkoumání bude správnou cestou, k léčbě X-ALD [93, 109, 110].

2.6 Chromatografie

Chromatografie je metoda, která slouží k oddělení složek ze vzorku. Jednotlivé složky můžeme stanovovat kvantitativně a kvalitativně. Molekuly analytu se u chromatografické separace rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi, které jsou mezi sebou nemísitelné. Mobilní fáze se pohybuje chromatografickým systémem a přivádí vzorek do nepohyblivé, stacionární,

fáze, kde dochází k separaci analytu, a to zachycením jednotlivých částí analytu ve stacionární fázi.

Díky tenkovrstvé chromatografii můžeme lipidy klasifikovat do tříd a oddělit je od sebe. Dalším typem chromatografie je plynová chromatografie, která slouží např. separaci a identifikaci mastných kyselin. Při plynové chromatografii je důležitá derivatizace [3, 113].

2.6.1 Derivatizace

Derivatizace zlepšuje citlivost, selektivitu a umožňuje identifikaci. Derivatizace se také užívá, aby separace látek mohla být vůbec provedena. Každá chromatografie požaduje jinou derivatizaci na separovanou látku. U plynové chromatografie je potřeba, aby derivatizované látky byly těkavější než látky původní [111, 114]. Metodou derivatizace u této chromatografie je příprava methylesterů mastných kyselin (FAME), které jsou připravovány bazicky nebo kyselou katalyzovanou esterifikací. U bazicky katalyzované methanolýzy se častokrát používá NaOH nebo KOH. Pro kyselou katalyzovanou esterifikaci se používá HCl, BF₃ a H₂SO₄. HCl se používá nejčastěji, protože je to poměrně slabé činidlo a poskytuje kvantitativní výtěžky [113].

2.6.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je rychlá a jednoduchá analytická metoda, a přitom velmi efektivní. Principem je rozdělení jednotlivých látek mezi postupující mobilní (pohyblivou) fázi rozpouštědla a stacionární (pevnou) fázi tenké vrstvy. Mobilní fáze jsou organická rozpouštědla např. metanol, hexan či aceton. Tenká vrstva může být ze sulfolu (silikagel), alufolu (Al₂O₃), křemeliny nebo polyamidu. Jsou to 5-40 μm velké částice, které jsou nanášené na skleněných deskách nebo na hliníkových foliích. Pojivem je sádra a škrob nebo jsou sintrované ke skleněné podložce [115, 116].

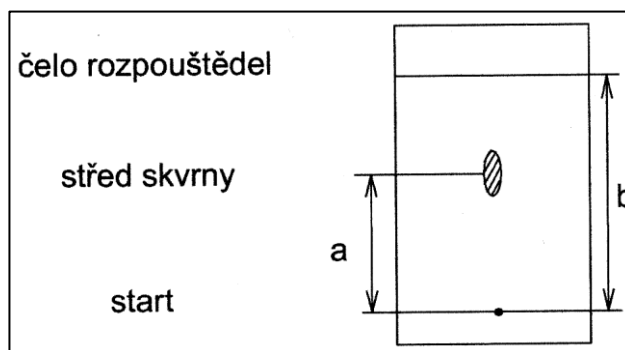
Vzorky se nanášou buď manuálně či automatickými aplikátory na startovní skvrnu na kartě a může být nanášen větší počet vzorků současně v rozumné vzdálenosti od sebe. Destička se poté vloží do vyvíjecí komory, ve kterém je rozpouštědlo (vyvíjecí souprava), a to začne okamžitě vzlínat silikagelem vzhůru. Při svém vzlínání mobilní fáze silikagelem narazí na látku ve skvrně a začne je dělit [115, 117].

Při vyhodnocení jsou barevné látky na tenké vrstvě vidět, takže není potřeba uskutečnit detekci. Když jsou látky bezbarvé, tak musíme použít ke zviditelnění použít postřík

s vhodnými chemickými činidly (I_2 , H_2SO_4) nebo můžeme použít absorbenty s fluorescenčním indikátorem a chromatogram pozorovat pod UV světlem [115, 1116].

V soustavách pozorujeme skvrny látek v různých vzdálenostech od startu k čelu (místo kam až dovlínala mobilní fáze). Chromatogram se vyhodnocuje pomocí retardačního (retenčního) faktoru (R_F), což je bezrozměrná veličina, která nabývá hodnot od nuly do jedné. Hodnota R_F je poměr vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti čela mobilní fáze od startu [115].

$$R_f = a/b$$



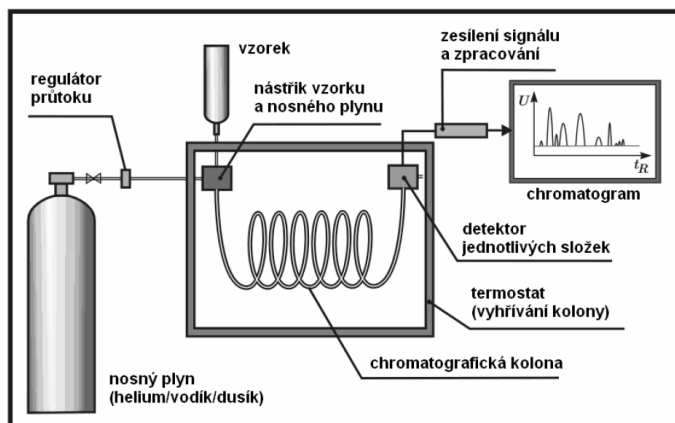
Obr 5.: Vyhodnocení chromatogramu- R_F z [7].

2.6.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie slouží k separaci plynů a par za zvýšené teploty a využívá dvě heterogenní fáze. Metodou lze separovat i velice komplikované směsi těkavých analytů. Mobilní fází je nosný plyn, který nemá chemickou afinitu ke stacionární fázi nebo ke složkám vzorku. Mobilní fází může být He, N_2 , H_2 , Ar nebo i vodní pára. Stacionární fáze může být buď tuhá (adsorbent) nebo kapalná (zakotvená nebo chemicky vázaná na nosiči). Plynový chromatograf se skládá ze zdroje nosného plynu, regulačního systému, dávkovacího zařízení, termostatu, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení (počítač) [118, 119, 120].

Principem plynové chromatografie je dávkování vzorku do proudu inertního plynu, který vzorek dále přenáší kolonou. Aby došlo ke transportu vzorku, musí dojít k jeho přeměně na plyn. Složky se separují díky vlastnosti se různě vázat na stacionární fázi, k čemuž dochází v koloně. Po separaci v koloně jdou složky do detektoru, a díky jeho signálu se určí druh složek a jejich kvantita. Výsledek se nazývá chromatogram [118, 119].

Mastné kyseliny se stanovují především pomocí GC a RP-HPLC, nejdříve musí dojít k derivatizaci a k rozdělení do jednotlivých lipidových tříd. Metody GC s velmi kvalitními kapilárními kolonami dosahují citlivých a reprodukovatelných analýz FA [121, 122, 123].



Obr 6.: Schéma plynového chromatografu. Převzato a upraveno z [8].

3.6.3.1 Nosný plyn

Mobilní fází plynové chromatografie je inertní plyn, který se neúčastní interakcí obstarává transport látek kolonou. Permanentní plyny jsou skladovány v tlakové lahvi, kvůli vysoké čistotě a bez přístupu kyslíku. Inertním plynem je v praxi He, N₂, H₂ nebo Ar. Helium je nejlepší pro kapilární kolony (největší celková účinnost). Vodík se používá u vysokorychlostní GC a je bezpečnější než helium. Volba nosného plynu závisí především na typu detektoru, inertnosti, čistotě, viskozitě, hustotě a na bezpečnosti při práci, protože ovlivňuje účinnost a rychlost analýzy. Viskozita a hustota ovlivňují difúzi a průtok plynu kolonou a viskozita roste s rostoucí teplotou [118, 119].

3.6.3.2 Regulátor tlaku a průtoku

Průtok ovlivňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu. Regulací průtoku (tlaku) jde nastavit konstantní nebo programově se měnící průtok (tlak) nosného plynu [118, 119].

3.6.3.3 Dávkovací zařízení

Dávkování musí být rychlé a reprodukovatelné, kvůli složení vzorku (rozklad, zplynění), kvůli šumu přístroje atd. Je to jeden z nejdůležitějších kroků, protože bez spolehlivého dávkování nejsou výsledky spolehlivé. Plynné a kapalně vzorky jsou zaváděny injekční mikrostříkačkou, a to buď manuálně nebo automaticky. Dávkování probíhá přes průpichový uzávěr ze silikonové pryže (septum) nebo přes kohout, přímo nebo pomocí

děliče toku. Dávkovaný objem je obvykle v rozmezí 0,1 – 10 μl . Výběr dávkovací metody je důležitý zejména u kapilárních kolon, protože je rozhodující pro kvalitní separaci a u náplňových kolon je dávkování jednodušší. Dávkovače jsou odpařovací neboli split/splitless (vzorek je nadávkován do horké zóny a dojde k okamžitému odpaření) nebo neodpařovací neboli cold-on column (vzorek je nadávkován do studené zóny a k odpaření dojde až vlivem teplotního programu) [119, 120].

3.6.3.4 Termostat

Termostat zajišťuje dostatečně vysokou teplotu pro dávkovač, kolonu a detektor, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Analýza se provádí obvykle při 50-300 $^{\circ}\text{C}$. Podle druhu analýzy se používá stanovený teplotní režim. Termostat kolony představuje největší objem chromatografu [119, 120].

3.6.3.5 Kolony

V koloně, která je umístěna v termostatu, dochází k separaci složek. Typy kolon, které se v plynové chromatografii používají jsou náplňové a otevřené kapilární. Náplňové kolony jsou plněné chromatografickou náplní, délka je většinou 30-400 cm, průměr částic náplně je 100-250 μl a jsou vyrobené z hliníku, nerezové oceli či ze skla. Náplň může tvořit zrnitý pórovitý adsorbent nebo nosič se zakotvenou nebo chemicky vázanou náplní. Nosič je inertní a tvrdý (ze skla nebo syntetických polymerů) a slouží k deaktivaci adsorpčních vlastností. Otevřené kapilární kolony jsou ze skla nebo taveného křemene, který je potažený polyimidem. Stacionární fáze je zakotvená na nosiči nebo je chemicky vázaná. Otevřené kapilární kolony mají vyšší účinnost, vyšší počet separovaných píků a nižší kapacitu pro přetížení vzorků (přetížení). Délka kapiláry je 15-60 m a průměr je 0,1-0,6 mm. [118, 119, 120].

3.6.3.6 Detektory

U detektorů pro GC je důležitá stabilita signálu v čase, velká citlivost a rychlá odezva na složení eluentu. Detektory jsou destruktivní a nedestruktivní. Detektorem prochází nosný plyn, který obsahuje vzorek, vzorek reaguje na fyzikálně-chemické vlastnosti analytu, zesiluje a vysílá signál do vyhodnocovacího aparátu.

Principem tepelně vodivostního detektoru (TCD – thermal conductivity detector) je odporové vlákno, které je umístěné v cele detektoru, tímto vláknem prochází proud, dojde k ohřátí plynu a následuje jeho ochlazení. V měrné cele je eluát z kolony a v referenční cele je

mobilní fáze. Látka prochází detektorem, mění se teplota drátku a dojde ke změně odporu. Rozdíl v tepelné vodivosti je úměrný koncentraci. Tento detektor je koncentrační, univerzální, nedestruktivní a méně citlivý.

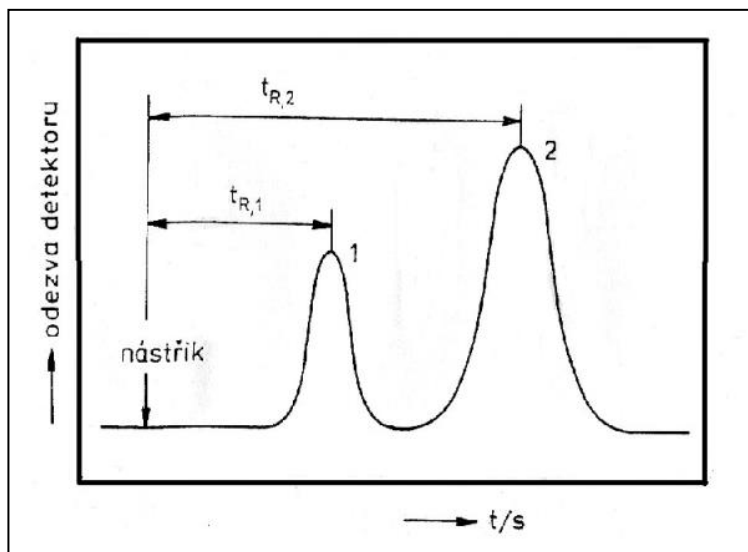
Principem plamenově ionizačního detektoru (FID – flame ionization detector) je, že eluát prochází z kolony do plamene, kde dojde ke spálení látek, vzniknou nabitě částice a roste proud mezi dvěma elektrodami. Tento detektor je nejpoužívanější, hmotnostní, citlivý destruktivní a téměř univerzální (pro látky, které lze spálit).

Termoionizační detektor (TID – thermionic detector) je selektivní pro sloučeniny, které obsahují N a P, je velmi citlivý, pracuje na stejném principu jako FID, ale plamen je studenější. Mezi elektrodami je keramický prsteneček s halogenidem z alkalického kovu.

Při průchodu destruktivním detektorem se analyt při detekci nevratně změní (FID, TID nebo MS) [118, 119, 120].

3.6.3.7 Chromatogram

Záznam z chromatografu (Obr 7.), který znázorňuje jednotlivé analyty, a to nejčastěji ve formě tzv. chromatografických píků oddělených navzájem základní linií, se nazývá chromatogram. Vyhodnocovací zařízení přijímá signál z detektoru a nástřik odpovídá době zavedení vzorku na kolonu. Na ose y je odezva detektoru a na ose x je retenční čas, který odpovídá vrchu píku od nástřiku. Retenční čas se využívá ke kvalitativní analýze a ke kvantitativní analýze se využívá plocha píku, která je úměrná koncentraci analyzované látky [118, 119, 120].



Obr 7: Chromatogram z [9].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Analyzované vzorky

Krev pacientů byla získána z klinicko-biochemické laboratoře Lékařské fakulty Univerzity Tübingen a anonymně zpracována v souladu s povolením etické komise Lékařské fakulty Univerzity Tübingen. Vzorky pro tuto studii byly poskytnuty Univerzitou Tübingen v Německu. Výsledky těchto analýz jsou doplněny o průměrné hodnoty získané od skupiny zdravých dárců krve, rovněž mužů s věkovým rozmezím 20 – 30 let. Všichni dárči souhlasili s odběrem žilní krve a jejím použitím pro studijní a vědecké účely. Poté se krev odebrala do EDTA zkumavek a byla podrobena centrifugací (3500 rpm, 10 minut) pro získání plasmy. Krevní plasma byla ultracentrifugací separována na jednotlivé frakce lipoproteinů – VLDL, LDL, HDL. Některé vzorky byly použity na analýzu, uchovávaly se při – 20 °C.

3.2 Laboratorní vybavení

3.2.1 Přístroje a pomůcky

a) Přístroje

- Plynový chromatograf: Agilent Technologies 7890A GC Systém
- Výrobce: AGILENT TECHNOLOGIES, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Kolona: HP-88
- 100 m x 0,250 mm x 0,20 µm, teplotní limit 50°C-250°C, pro dělení methylesterů mastných kyselin
- Výrobce: AGILENT TECHNOLOGIES, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Termoblok: Pierce Reacti-Therm Heating/Stirring Module a odpařovací zařízení, model 18971 a 18821
- Výrobce: THERMOSCIENTIFIC, 28 Schenck Parkway, Asheville, Severní Karolína 28803 USA
- Centrifuga: MPW-340
- Výrobce: MECHANYKA PRECYZNA, Polsko
- Distributor: Servis Unimed, Vestec 41, 252 42 Vestec u Prahy, Česká Republika
- Třepačka: Vortex typ Reax top

- Výrobce: HEIDOLPH INSTRUMENTS GMBH & CO. KG, Walpersdorfer Strasse
12, 911 26 Schwabach, Německo
- Chlazená odstředivka: Eppendorf 5417R
 - Výrobce: Eppendorf, Německo
- b) Pomůcky**
- Chromatografické desky: TLC Silica gel 60
 - Glass plates 20x20 cm, balení 25 kusů
 - Výrobce: MERCK, 642 71 Darmstadt, Německo
- Lampa UV: 240
 - 230 V
 - Výrobce: A. Krüss Optronic GmbH, Alsterdorfer Strasse 276-278, 22297 Hamburg, Německo
- Magnetická mikromíchadla
 - PTFE hladké, Polygon, L 8 mm, D 3 mm
 - Výrobce: Carl Roth GmbH + Co D, 76185 Karlsruhe, Německo
- Zkumavky Pyrex: 1636/26MP, 761152 Culture Tube 16x100 SVL SCRE s teflonovým těsněním
 - Výrobce: BARLOWORLD SCIENTIFIC GROUP LIMITED, Beacon Road, Stone, Staffordshire, Velká Británie
- Chromatografické vialky s pryžovým septem: typ 5188-6599
 - Výrobce: AGILENT TECHNOLOGIES, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Inerty do chromatografických vialek: typ 8010-0132
 - Výrobce: AGILENT TECHNOLOGIES, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Desaga spray gun
 - Dünnschicht-chromatographie, Thin-layer
 - Výrobce: Desaga GmbH D-690 Heidelberg 1, Německo
- Chromatografická vana
- Automatické pipety (100, 250, 500, 1000 µl)
- Skleněné pipety (1, 5, 10 ml)
- Pasteurovy skleněné kapiláry
- Kádinky, odměrné válce, zkumavky, stojánky na zkumavky, špachtle

3.2.2 Chemikálie a další používaný materiál

a) Deproteinační roztok (izopropylalkohol, n-heptan, kyselina fosforečná)

- Izopropylalkohol, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 99,95 %, $M_r = 60,1 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,78 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: PP/2015/12107
 - Výrobce: Lach-ner s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika
- n-heptan, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 98,25 %, $M_r = 100,21 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,68 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: PP/2015/14672
 - Výrobce: Lach-ner s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika
- Kyselina orto-fosforečná, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 85 %, $M_r = 98 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,7 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: 1801230113
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika

b) Mobilní fáze pro TLC (n-hexan, diethylether, kyselina octová)

- n-hexan, čistý
 - Balení 1000 ml, obsah 95 %, $M_r = 86,18 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,659 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: 1601240111
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika
- Diethylether, p.a., nestabilizovaný
 - Balení 1000 ml, obsah 99,7 %, $M_r = 74,12 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,714 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: 1512091214
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika
- Kyselina octová, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 99 %, $M_r = 60,05 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,05 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: 1907280714
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika

c) Detekční činidlo

- 2,7-dichlorfluorescein
 - Balení 100 ml, číslo šarže: 319108554
 - Výrobce: Carl Roth GmbH + Co D, 76185 Karlsruhe, Německo

d) Další chemikálie

- Methylalkohol, p.a.

- Balení 1000 ml, obsah 99,98 %, $M_r = 32,04 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,79 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: PP/2013/01048
- Výrobce: Lach-ner s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika
- Toluen, p.a.
 - Balení 1000 ml, obsah 99,28 %, $M_r = 92,14 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,87 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: PP/2013/02444
 - Výrobce: Lach-ner s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika
- Chloroform, p.a., stabilizovaný, 1 % ethylalkohol
 - Balení 1000 ml, obsah 99,8 %, $M_r = 119,38 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,477 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: 1611101111
 - Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika
- 13,16,19-dokosatrienová kyselina
 - Výrobce: Švédsko
- Acetylchlorid, Reagent grade
 - Balení 500 ml, obsah 98 %, $M_r = 78,5 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,104 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: 101370555
 - Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Germany
- Uhličitan draselný, p.a., bezvodý
 - Balení 1000 g, obsah 99,7 %, $M_r = 138,21 \text{ g/mol}$, číslo šarže: PP/2013/12622
 - Výrobce: Lach-ner s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika

e) Tlakové láhve

- Dusík: N_2 4.0, UN 1066
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika
- Helium: He 5.0, UN 1046
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika
- Vodík: H_2 5.0 $\geq 99,999$
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika
- Kyslík: O_2 20 % (zbytek dusík), UN 1956
 - Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Denaturace proteinů a extrakce lipidů

Nejdříve se do pyrexových zkumavek nadávkovalo 500 μ l vzorku séra (standardu), k nim se napipetovalo 2,5 ml roztoku pro deproteinaci, který se skládal z: izopropylalkoholu, n-heptanu a 2M kyseliny fosforečné v poměru 40:20:1. Zkumavky byly opatřeny víčkem, které obsahovalo teflonové těsnění. Pomocí třepačky Vortex se tato směs protřepala a pak se inkubovala za laboratorní teploty 10 minut. Do zkumavky se napipetovala směs toluen:methanol v poměru 4:1 a to 1 ml a 1,5 ml destilované vody. Znovu se směs protřepala a byla podrobena centrifugací (10 min, 3000 otáček/minuta). Organická část směsi, která se vytvořila na horní vrstvě byla odpipetována do další zkumavky a odpařena v digestoři pod dusíkem do sucha.

3.3.2 Separace tenkovrstevnou chromatografií

1) Příprava chromatografické desky

Nejdříve se označily jednotlivé dráhy na chromatografické desce. Zvýrazněný start se nacházel 2,5 cm od spodní hrany desky a čelo se vyznačilo 1 cm od vrchního okraje. Povrch desky se dále rozčlenil na šest drah po 3 cm, které měly značené okraje rozsahu 1 cm.

2) Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze se skládala ze 160 ml hexanu, 6 ml 98 % kyseliny octové a 40 ml diethyletheru. Mobilní fáze se přemístila do chromatografické vany. Vana, uzavřená víčkem, se 30–40 minut sytila parami této směsi.

3) Chromatografie

Do odpařené směsi se napipetovalo 75 μ l chloroform:methanol (2:1) a celá náplň se opatrně přenesla Pasteurovými skleněnými kapilárami na chromatografickou desku. Samotné nanášení mohlo negativně ovlivnit migraci složek, proto nesmělo dojít k poškrábání startu. Uprostřed dráhy se krátkým tahem kapiláry umístěné na startu aplikoval vzorek. Zkumavky se průběžně proplachovaly 25 μ l roztokem chloroform:methanol (2:1). Standard, který je nutný pro určení frakcí se aplikoval do poslední dráhy. Zaslá deska se umístila do chromatografické vany, kde zůstala, dokud mobilní fáze nedosáhla označeného čela. Krabice, kterou se vana zakryla, se urychlovalo vyvíjením. Nakonec se deska vyjmula a vysušila v digestoři.

Takto došlo ke klasifikaci lipidů na pět tříd - PL, DG, FFS, TG a CE.

4) Detekce

Jako indikátor pro detekci standardu se na desku rovnoměrně rozprášil 2,7-dichlorfluorescein. Pro ostatní dráhy se aplikovala UV lampa.

5) Izolace jednotlivých složek lipidů

Jednotlivé složky lipidů se ohraničily podle standardu, a to tak že pod dolním a horním okrajem zůstalo 0,5 cm. Samostatné oblasti se rytím z chromatografické desky přesunuly do pyrexových zkumavek opatřené víčkem s teflonovým těsněním.

3.3.3 Převedení na methylestery – derivatizace

1) Příprava inertního standardu

Připravil se zásobní roztok o koncentraci 250 µg/ml složením 13,16,19-dokosatrienové kyseliny se směsí toluen:methanol (4:1), kterým se dolilo po rysku 100 ml odměrné baňky. Do 100 odměrné baňky se odměřilo 4 ml interního standardu a znovu doplnilo po rysku směsí toluen:methanol (4:1). Koncentrace se snížila na 10 µg/ml, která byla ideální pro analýzu.

2) Derivatizace

Interní standard složen z 13,16,19-dokosatrienové kyseliny (10 µg/ml) a směs toluen:methanol (4:1) se oboje po 1 ml odpipetovalo do pyrexových zkumavek se složkami lipidů. Dále se do zkumavek umístilo mikromíchadlo z teflonu a doplnilo se 200 µl acetylchloridu, která funguje jako katalyzátor esterifikace. Zkumavky se přesunuly do termobloku, kde se inkubovaly hodinu při 100 °C za stálého míchání. V dalším kroku se vzorky nechaly ustálit za laboratorní teploty v digestoři. Poté došlo k neutralizaci přidáním 5 ml 6 % uhličitanu draselného. Vzniklá směs se 2 minuty usilovně třepala a 10 minut centrifugovala. Oddělila se znovu organická složka do nových zkumavek a usušena dusíkem. Nakonec se do chromatografických vialek s inzertem přepipetoval odparek s 10 µl směsí toluen:methanol (4:1).

3.3.4 Separace plynovou chromatografií

Zpracované vzorky umístěné v chromatografických vialkách se zařadily do karuselu. Použil se plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s plamenově ionizační detekcí se specifickým nastavením.

Teplotní program na koloně:

- výchozí teplota 130 °C po dobu 1 minuty

- teplotní gradient:
 - o 2 °C/min. do teploty 176 °C po dobu 2 minut
 - o 1 °C/min. do teploty 186 °C po dobu 1 minuty
 - o 0,2 °C/min. do teploty 190 °C po dobu 1 minuty
 - o 1 °C/min. do teploty 220 °C po dobu 4 minut.

Jeden vzorek se analyzoval cca 92 minut a v módu split (10:1).

3.3.5 Vyhodnocení získaných výsledků

Koncentrace mastných kyselin v $\mu\text{mol/l}$ byly pomocí speciálního programu vytvořeného v software Microsoft Office Excel 2010 vypočteny z ploch píků odečtených z chromatogramů po analýze vzorků pomocí plynového chromatografu a jsou uvedeny v kapitole Přílohy, tabulka 1–4. Ke grafické interpretaci těchto koncentrací byly pomocí stejného software vytvořeny sloupcové grafy zahrnující vypočtené koncentrace a poměry mastných kyselin pacientů a kontrol.

4 VÝSLEDKY

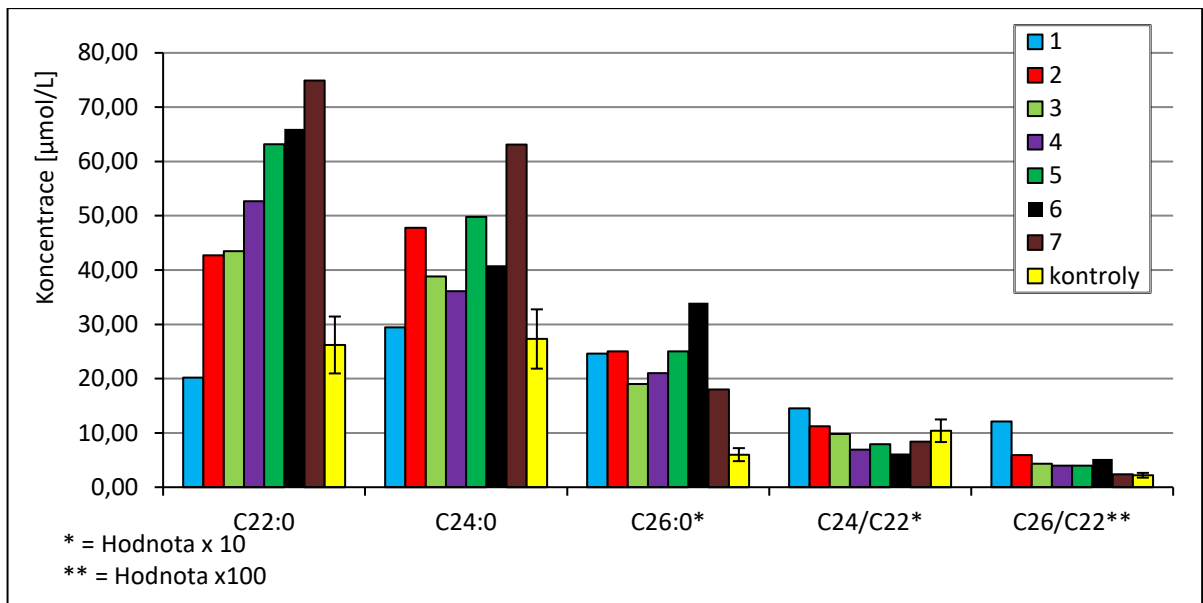
4.1 Soubor pacientů a kontrol

O pacientech je známo pouze to, že se jedná o mladší muže ve věku od 18 do 25 let s psychickými problémy, které se objevily před 1-2 lety a zahrnovaly impulzivní a chaotické chování (1 - 7), někteří nemocní mají přechodné (2 - 4), nebo trvalé problémy s pamětí 5 - 7), trpí zapomětivostí (3 - 7) a stěžují si na nespecifické bolesti nohou a rukou (4 - 7). U tří starších pacientů (4 - 6) se objevily i problémy s výslovností, s plynulostí mluvy a u jednoho pacienta se objevilo i výrazné zpomalení mluvy (7). Pacienty je proto možné rozdělit do tří skupin podle příznaků nemoci na mírně (1 - 4) a středně nemocné (5 - 7). Vzhledem k těmto příznakům bylo u všech pacientů provedeno vyšetření obsahu dlouhých mastných kyselin v plazmě a stanovení jejich poměrů podle klinických diagnostických postupů.

Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulce 1 a jsou doplněny o průměrné hodnoty získané od skupiny zdravých dárců krve, rovněž mužů s věkovým rozmezím 20-30 let. Na základě těchto výsledků byla u všech pacientů diagnostikována počáteční adultní X-vázaná adrenoleukodystrofie a to z důvodu značného zvýšení obsahu kyseliny cerotové C26 (referenční rozmezí činí 0,15 - 0,91 $\mu\text{mol/l}$) a překročení poměru C26/C22 (referenční rozmezí činí 0,00 - 0,022). Pro úplnost uvádím i referenční rozmezí kyseliny behenové C22 (30,5 - 97,7 $\mu\text{mol/l}$) a kyseliny lignocerové C24 (24,4 - 69,9 $\mu\text{mol/l}$), které u pacientů překročeno nebylo a to vzhledem k tomu, že se jednalo o prvozáchyťový screening. Tito nově zachycení pacienti nebyli prozatím léčeni.

Tabulka 1: Výsledky rutinní klinicko-biochemické analýzy plazmy pacientů a kontrol

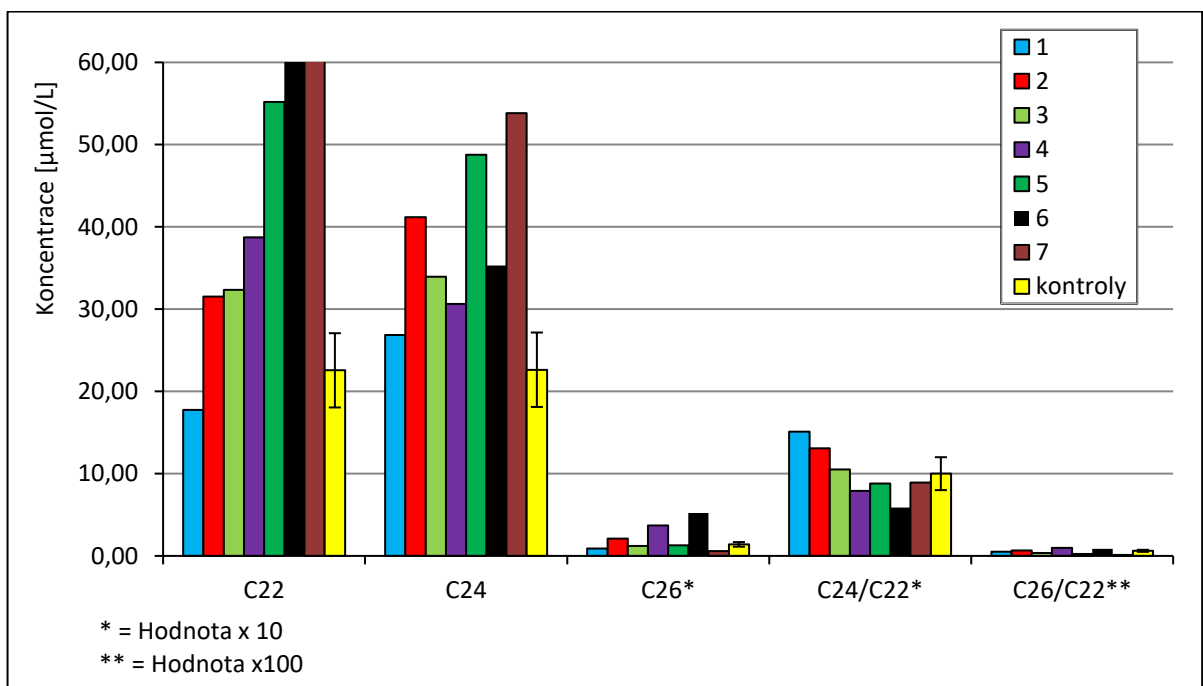
VLCFA poměr	1	2	3	4	5	6	7	kontroly
C22	20,21	42,7	43,5	52,7	63,2	66,0	74,9	26,2
C24	29,45	47,8	38,8	36,1	49,8	40,9	63,1	27,3
C26*	2,46	2,5	1,9	2,1	2,5	3,4	1,8	0,6
C24/C22*	1,45	1,12	0,98	0,69	0,79	0,62	0,84	1,04
C26/C22**	0,121	0,059	0,043	0,040	0,040	0,52	0,024	0,022



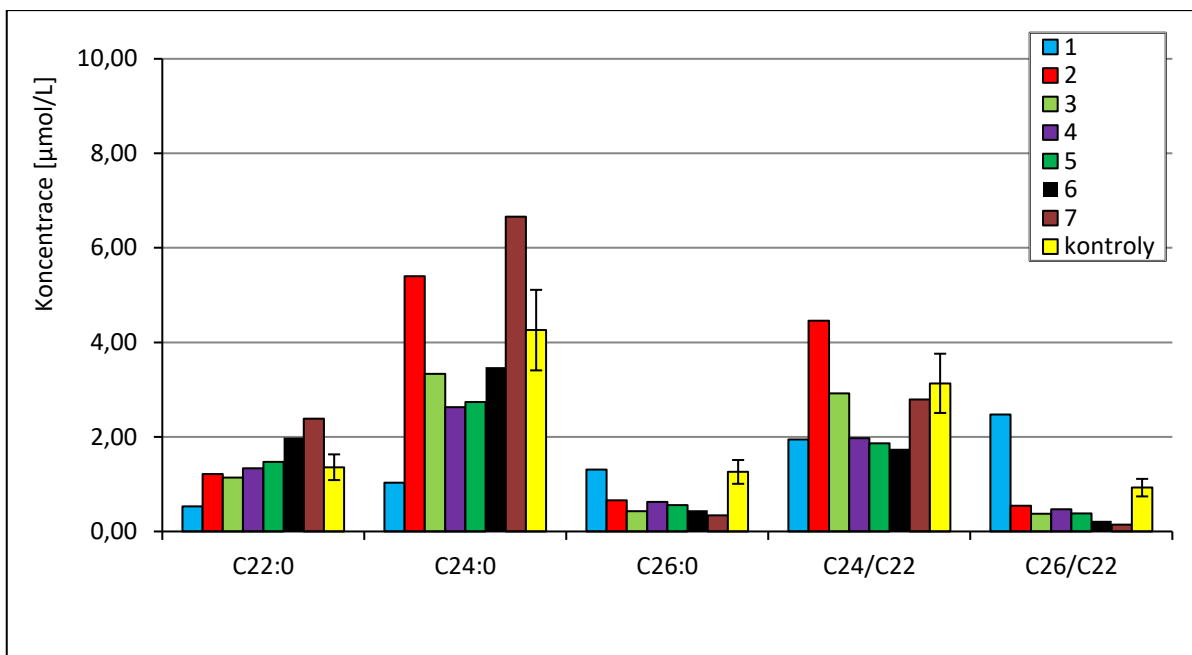
Graf 1: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 v plazmě.

4.2 Plasma

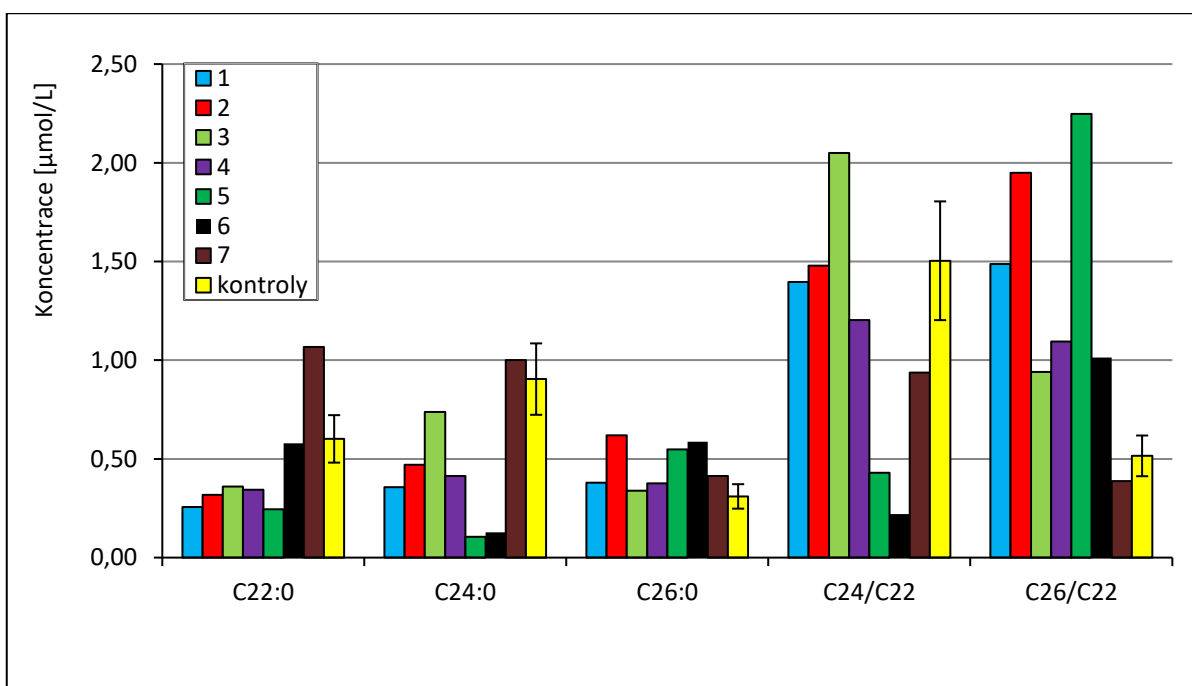
4.2.1 Základní ukazatelé X-ALD v lipidových frakcích



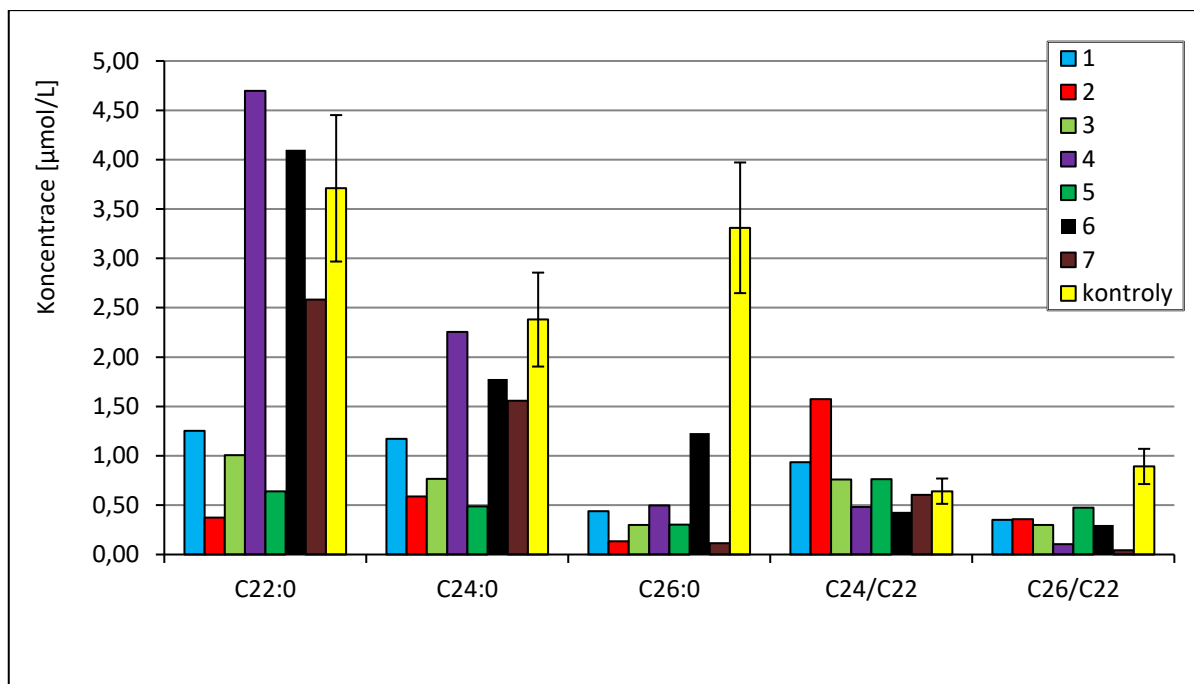
Graf 2: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci PL.



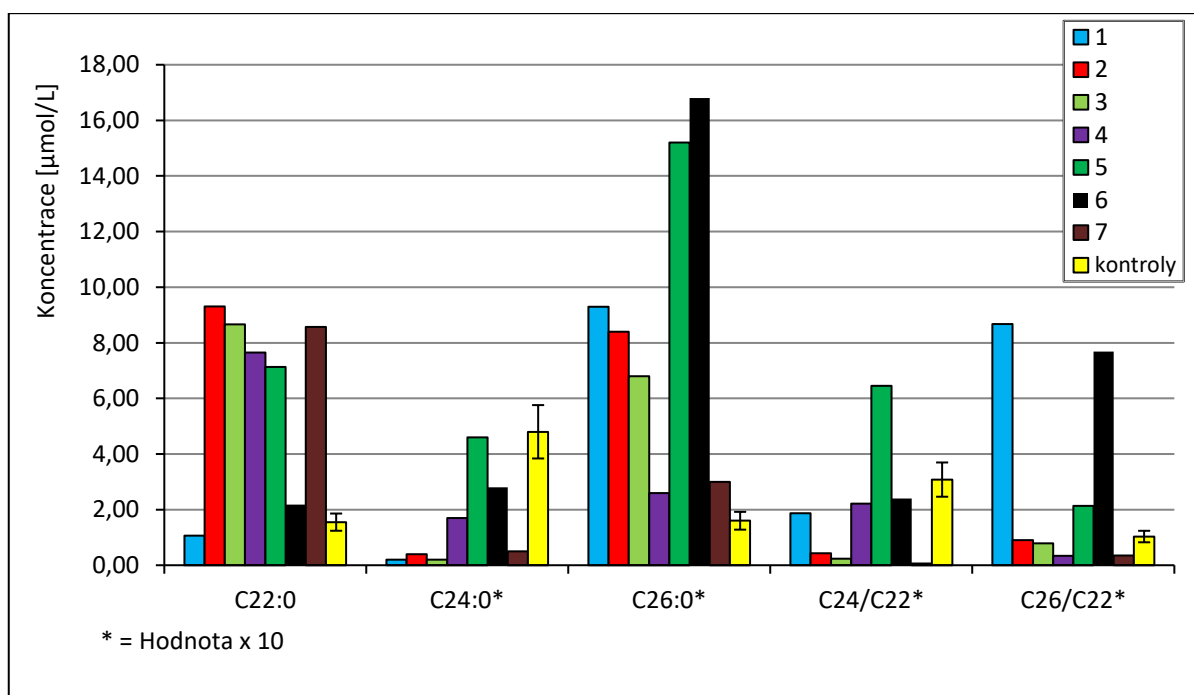
Graf 3: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci DG.



Graf 4: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci FFS.



Graf 5: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci TAG.



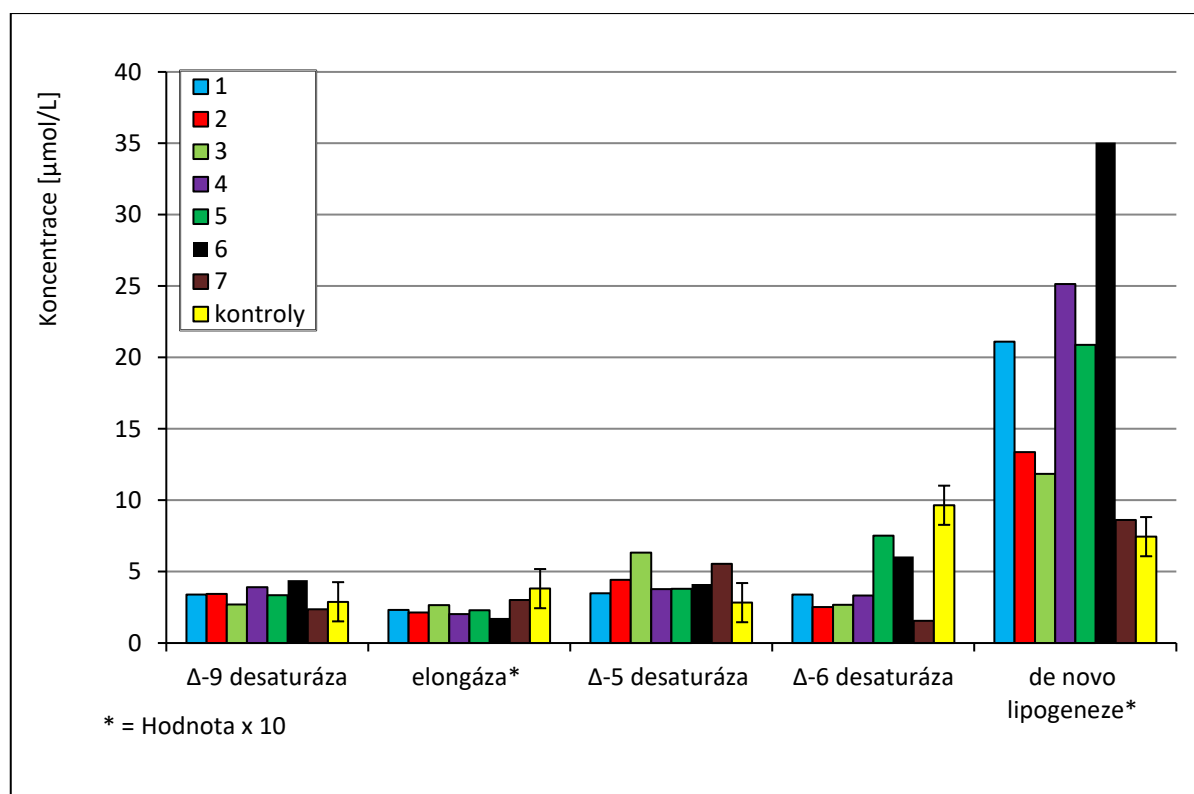
Graf 6: Koncentrace mastných kyselin C22, C24, C26 a poměrů C24/C22, C26/C22 ve frakci CE.

Pro podrobnější studium rozdělení diagnosticky významných mastných kyselin C22, C24, C26 a jejich poměrů C24/C22 a C26/C22 byly studované vzorky plasmy rozděleny pomocí chromatografie na tenké vrstvě do pěti lipidových frakcí, které zahrnovaly: fosfolipidy (PL), diacylglyceroly (DG), volné mastné kyseliny (FFS), triacylglyceroly (TG)

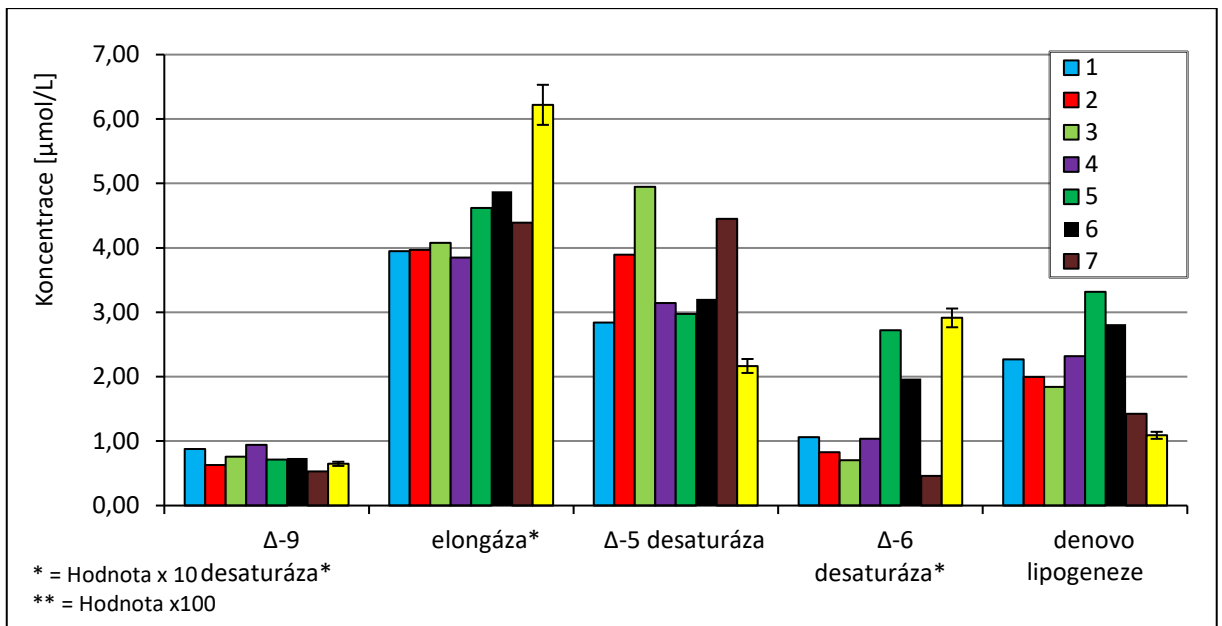
a estery cholesterolu (CE). Bylo zjištěno, že kyselina C22 se kumuluje ve frakci PL a CE, kyselina C24 se kumuluje přednostně ve frakci PL a v malém množství i ve frakci DG, zatím co kyselina C26 se kumuluje výhradně ve frakci ve frakci CE. Proto byly frakce PL, DG a CE podrobněji prostudovány.

4.2.2 Aktivitní indexy enzymů

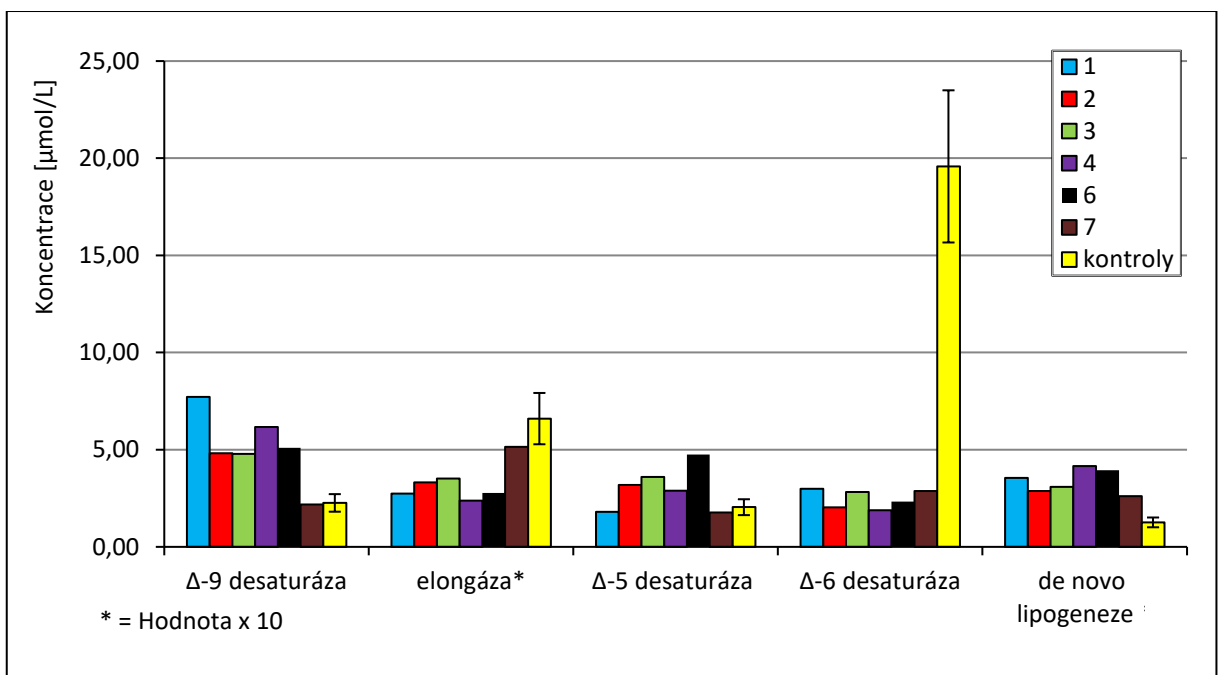
Aktivita enzymů se vyjadřuje relativním poměrem produkt/substrát, tento poměr se nazývá aktivní index. Aktivitní index Δ^9 -desaturázy byl vypočten jako podíl koncentrací kyselin C18:1-N9/C18:0, Δ^5 -desaturázy 20:4N6/20:3N6 a Δ^6 -desaturázy 20:3N6/18:2N6. Hodnoty u elongázy byly získány z podílu kyselin 18:0/16:0 a aktivitní index popisující buněčnou syntézu kyseliny palmitové je označován jako „de novo lipogeneze“ 16:0/18:2N6.



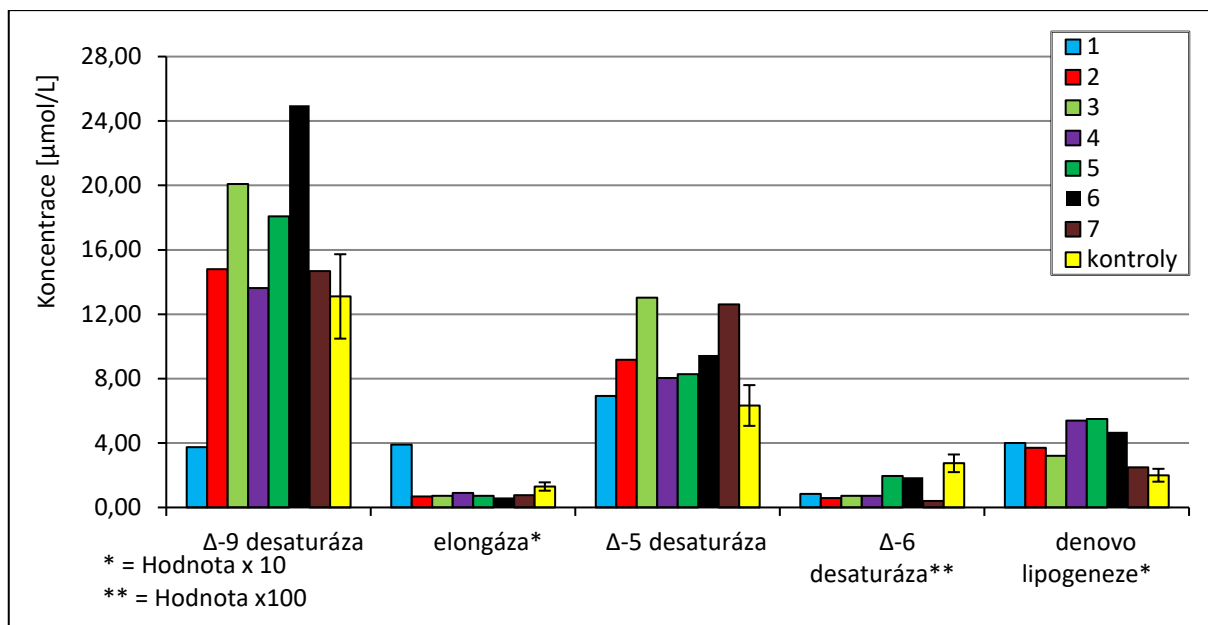
Graf 7: Aktivitní indexy enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze v plazmě.



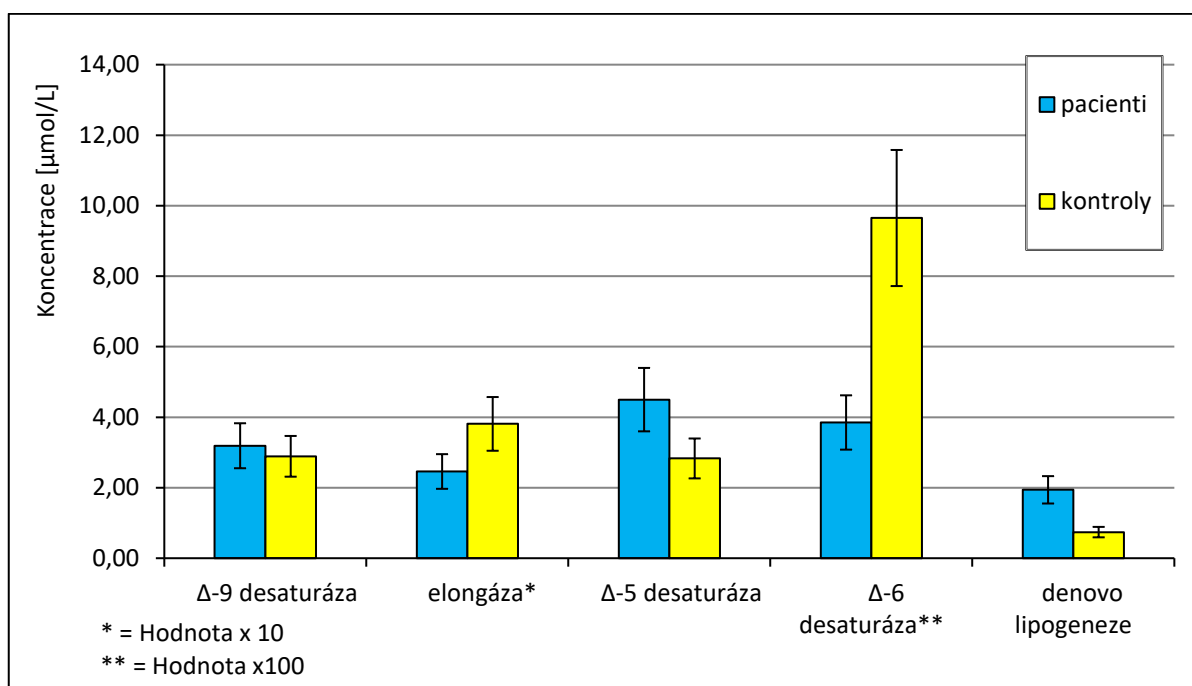
Graf 8: Aktivitní indexy enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze ve frakci PL.



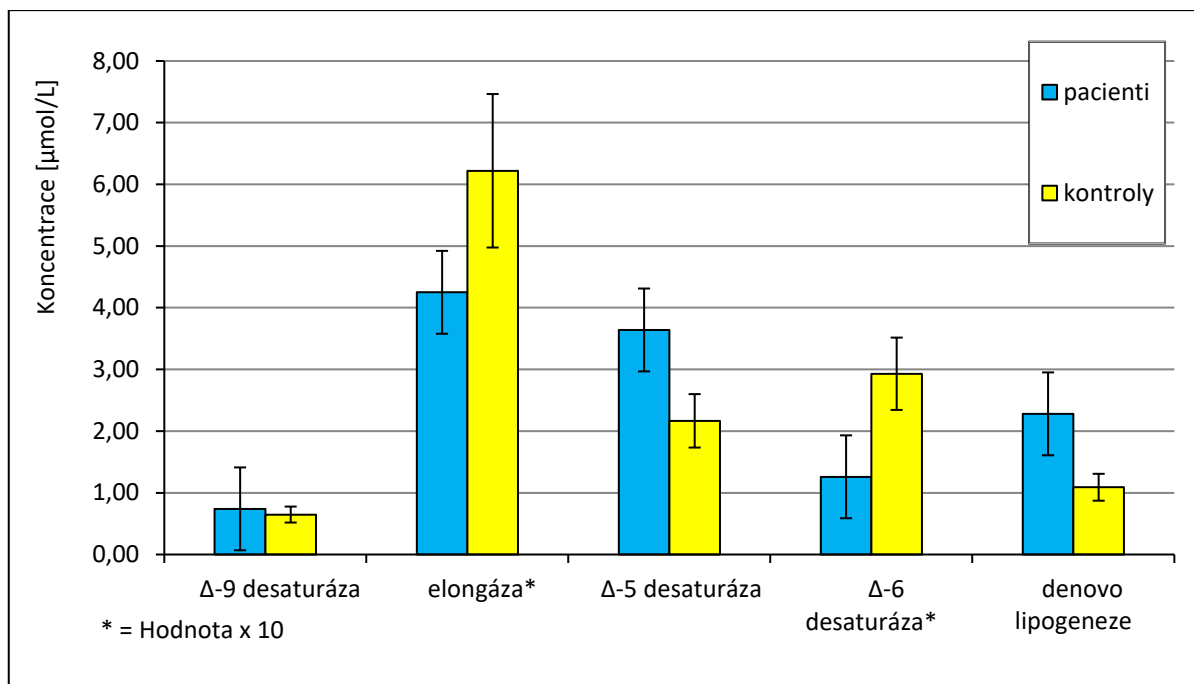
Graf 9: Aktivitní indexy enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze ve frakci DG.



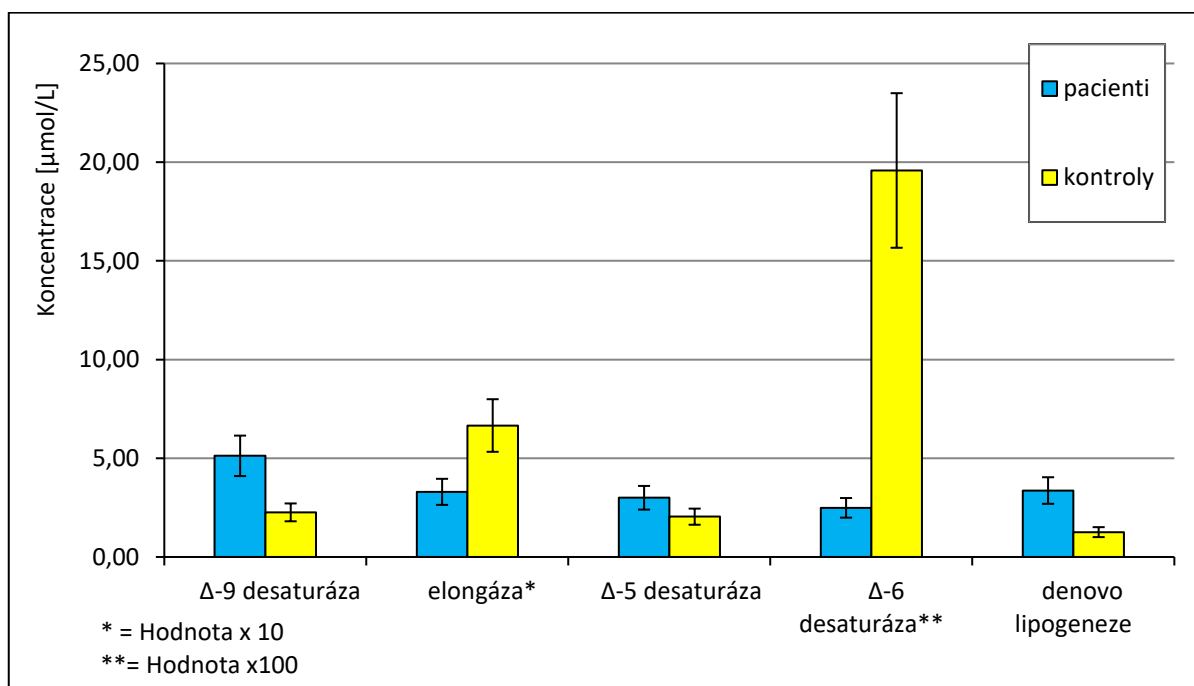
Graf 10: Aktivitní indexy enzymů Δ-desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze ve frakci CE.



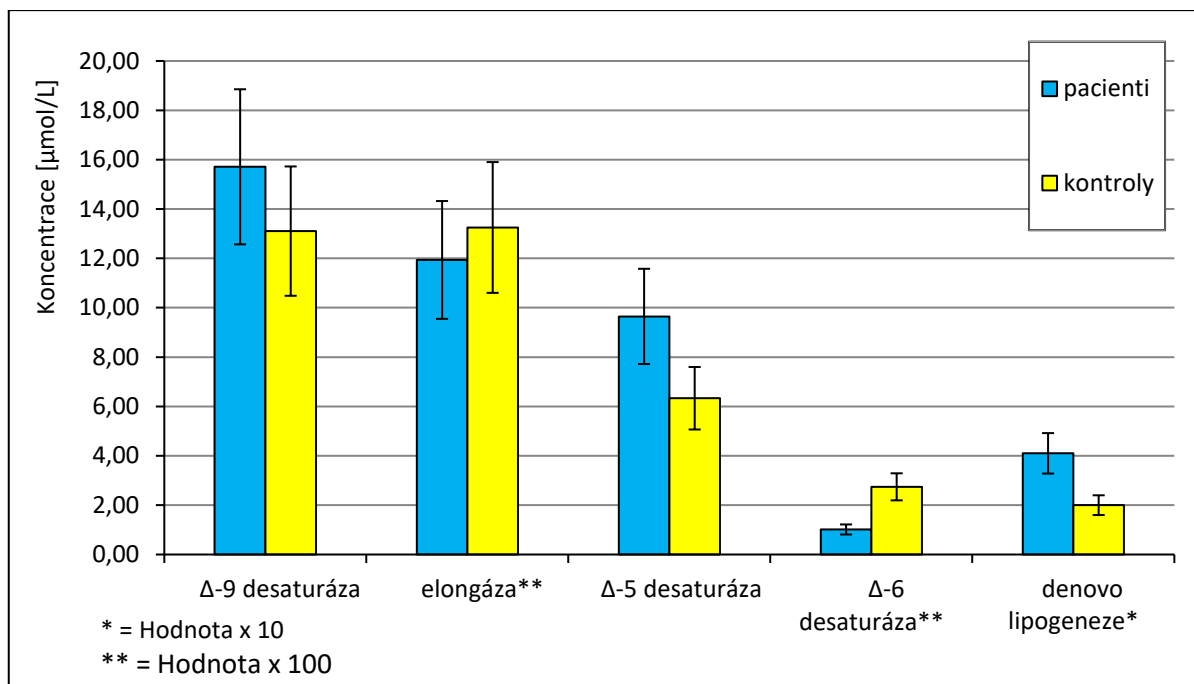
Graf 11: Porovnání průměrných hodnot aktivitních indexů enzymů Δ-desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou v plazmě.



Graf 12: Porovnání průměrných hodnot aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci PL.

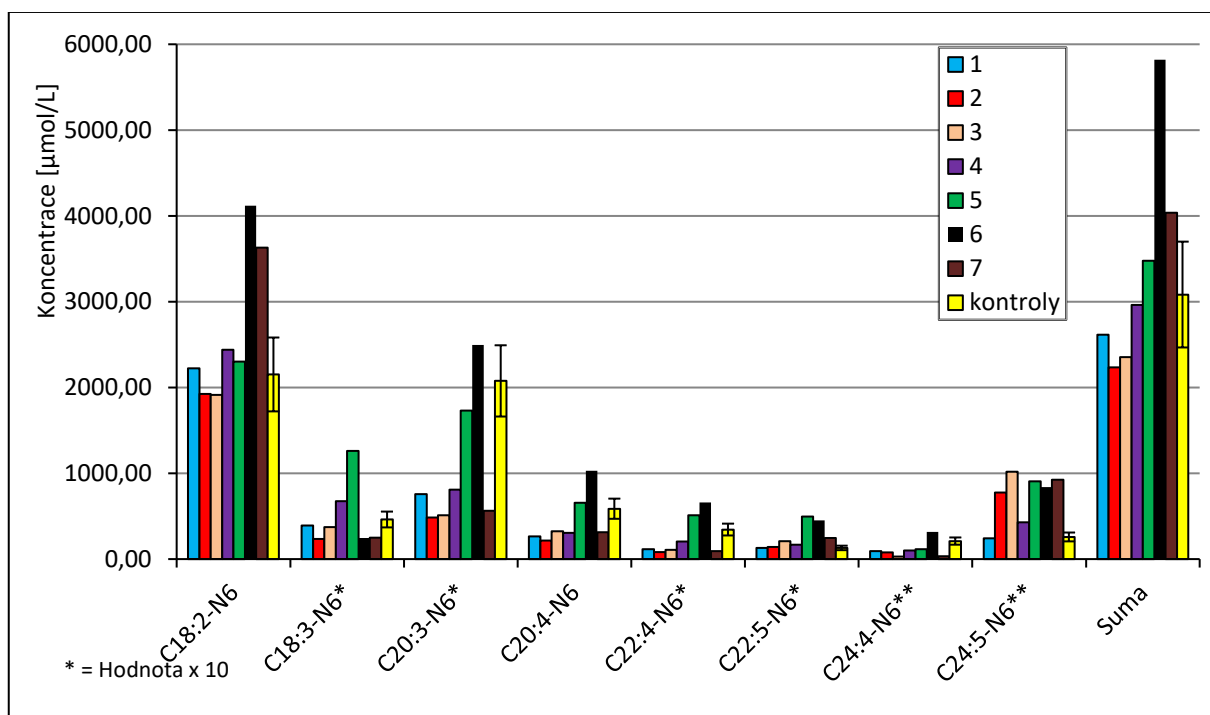


Graf 13: Porovnání průměrných hodnot aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci DG.

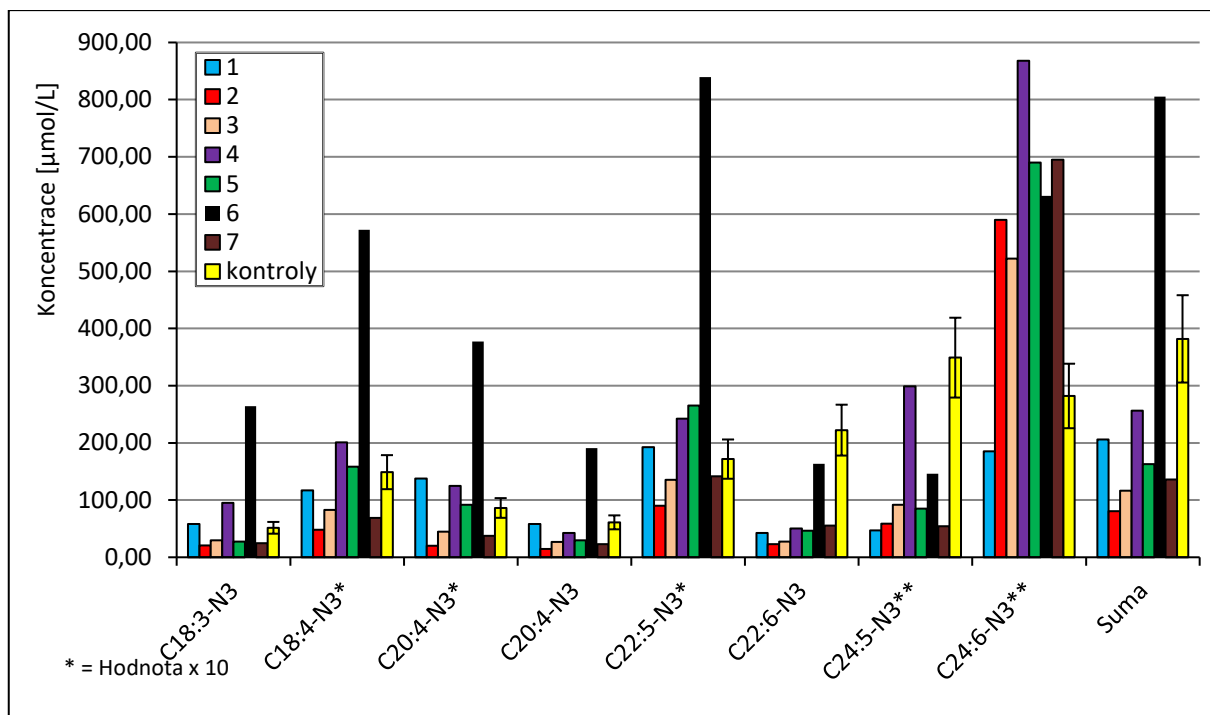


Graf 14: Porovnání průměrných hodnot aktivních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci CE.

4.2.3 Esenciální mastné kyseliny v plazmě

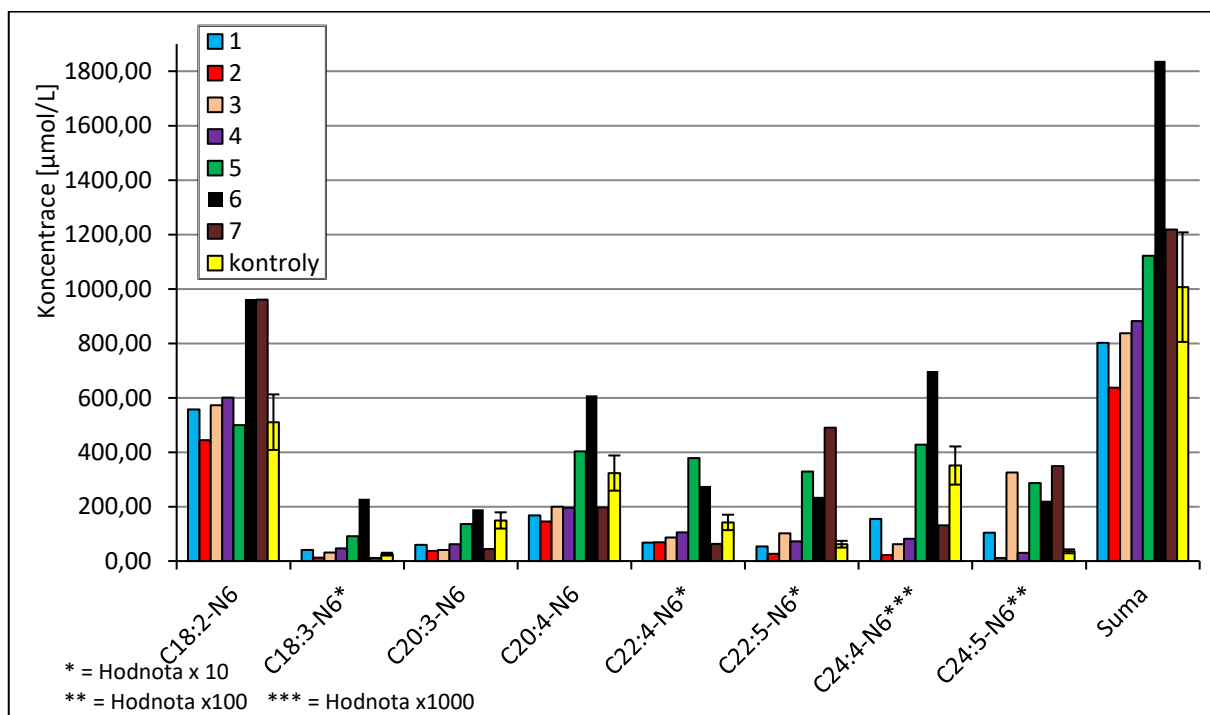


Graf 15: Koncentrace ω -6 mastných kyselin v plazmě.

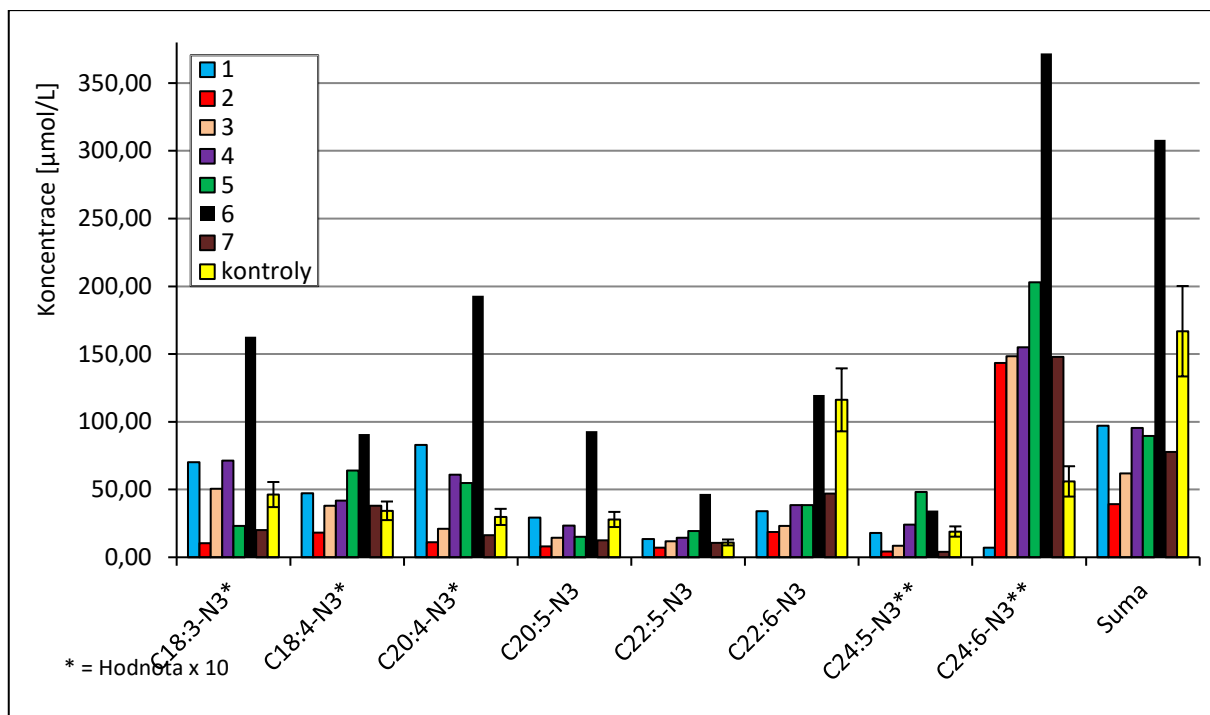


Graf 16: Koncentrace ω -3 mastných kyselin v plazmě.

4.2.4 Esenciální mastné kyseliny ve frakci PL

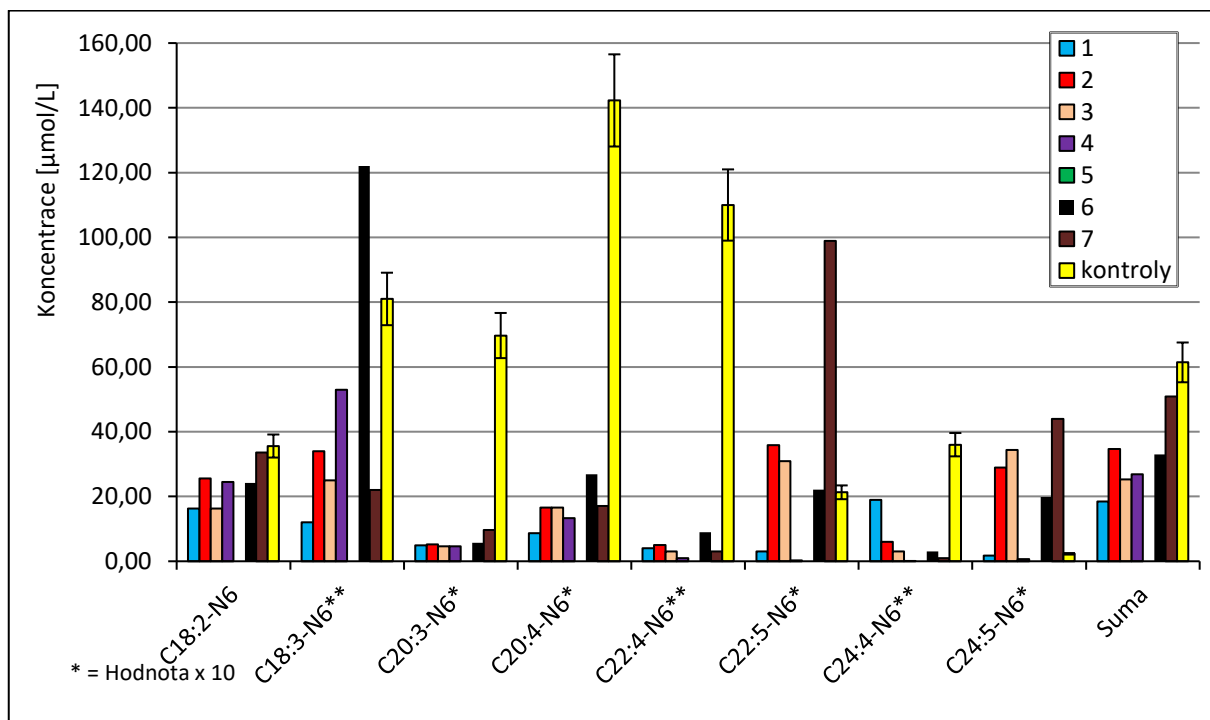


Graf 17: Koncentrace ω -6 mastných kyselin ve frakci PL.

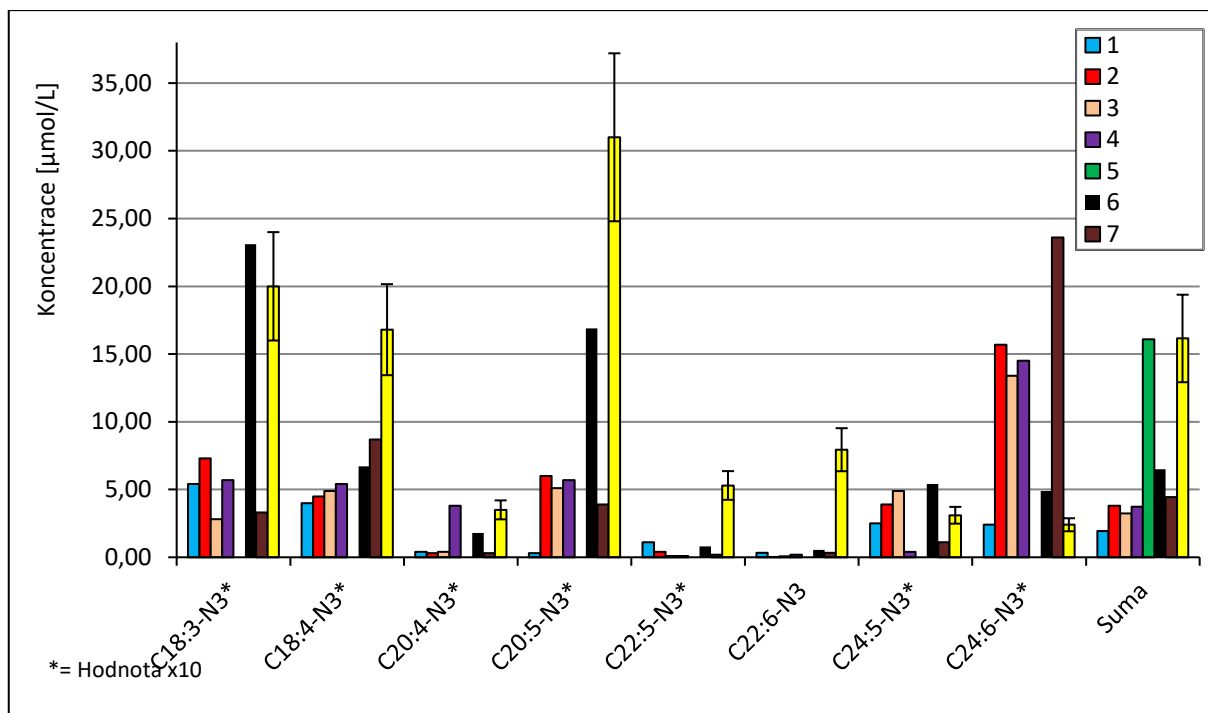


Graf 18: Koncentrace ω-3 mastných kyselin ve frakci PL.

4.2.5 Esenciální mastné kyseliny ve frakci DG

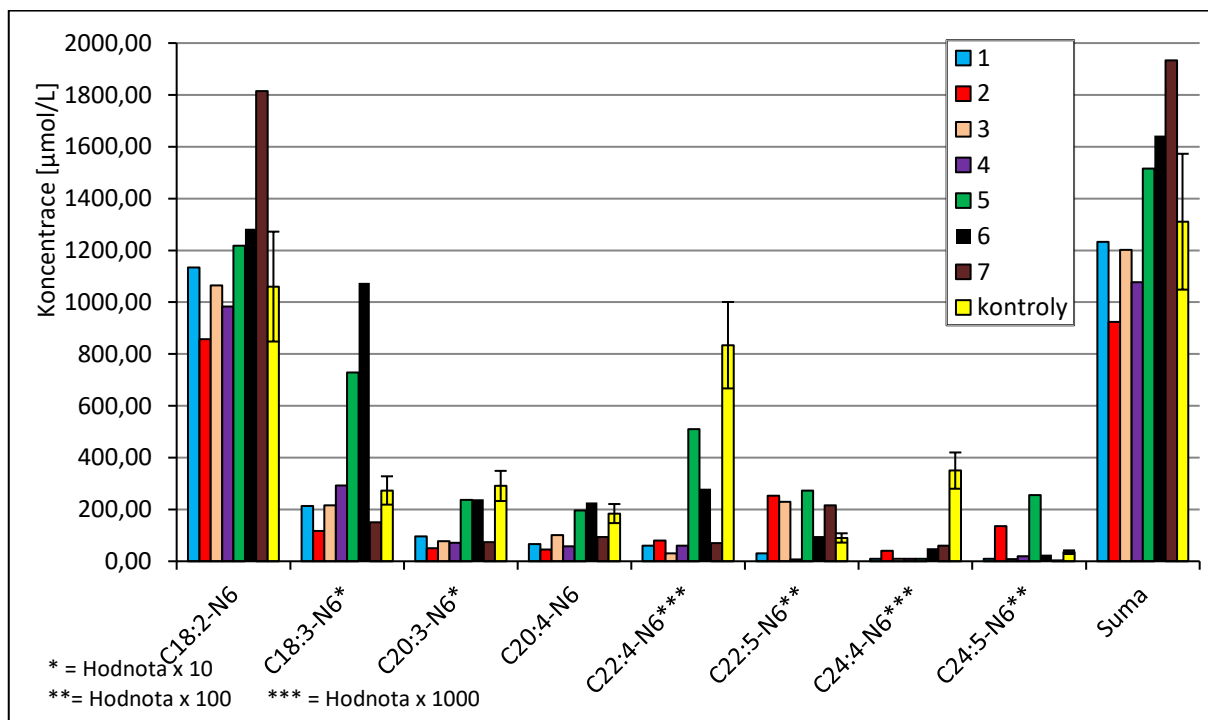


Graf 19: Koncentrace ω-6 mastných kyselin ve frakci DG.

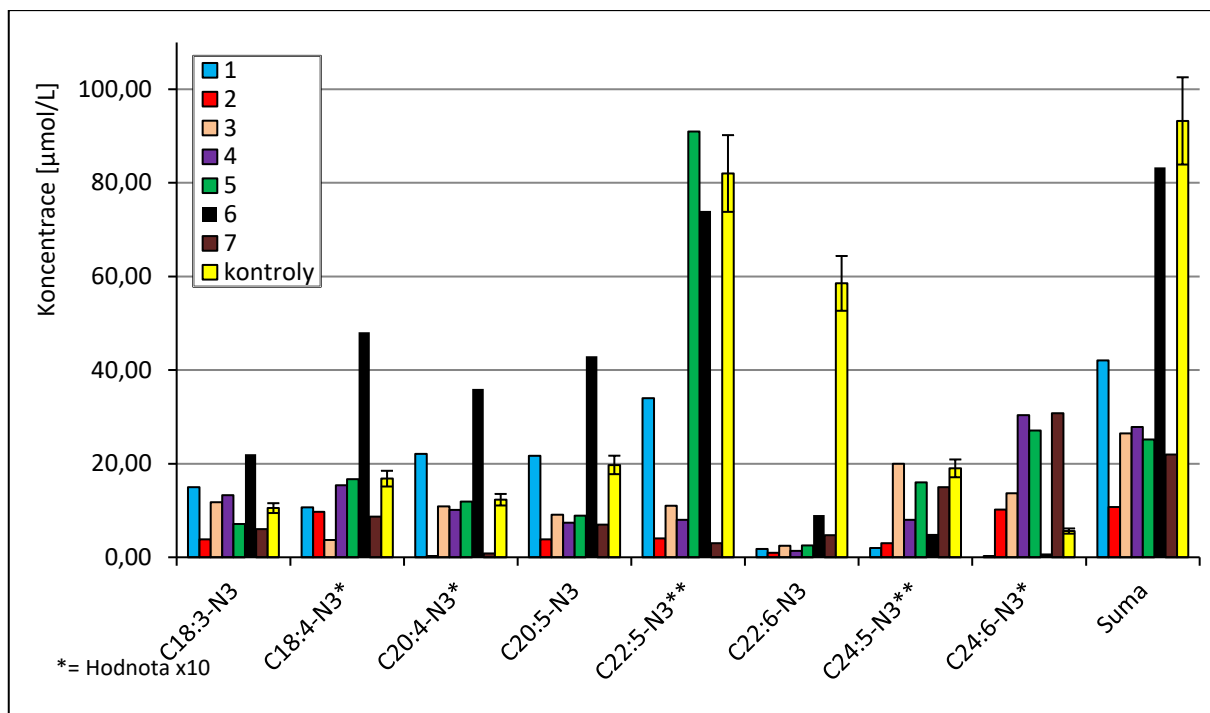


Graf 20: Koncentrace ω -3 mastných kyselin ve frakci DG.

4.2.6 Esenciální mastné kyseliny ve frakci CE

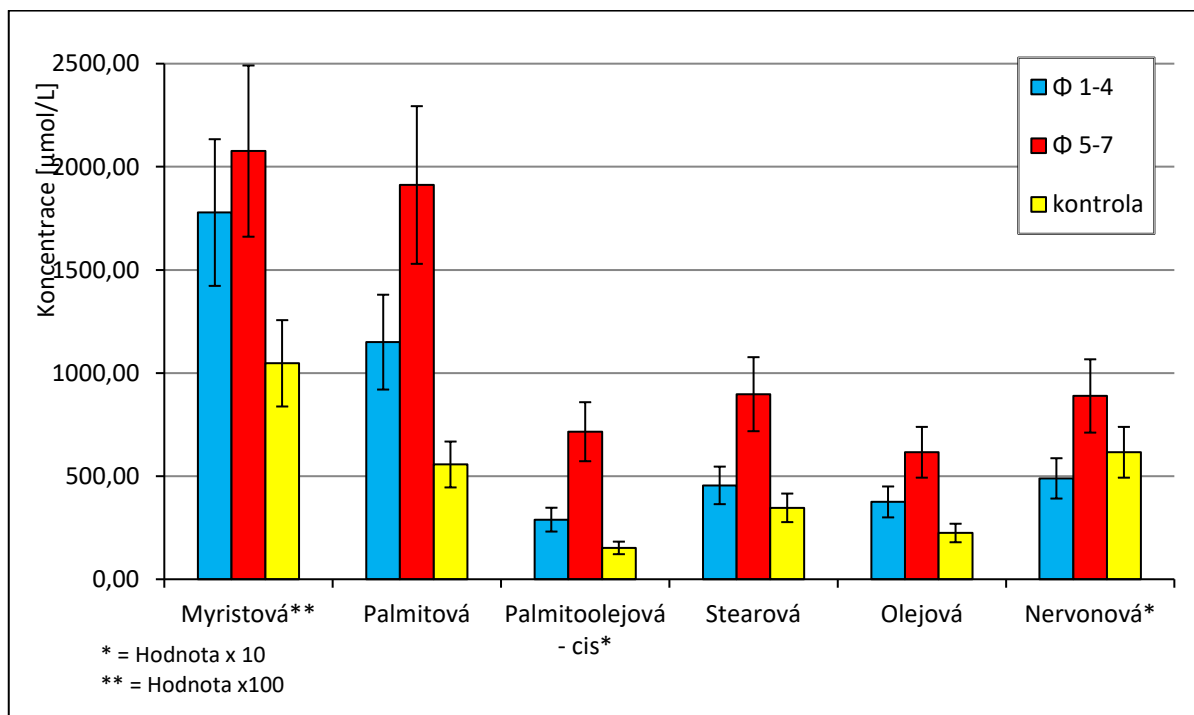


Graf 21: Koncentrace ω -6 mastných kyselin ve frakci CE.



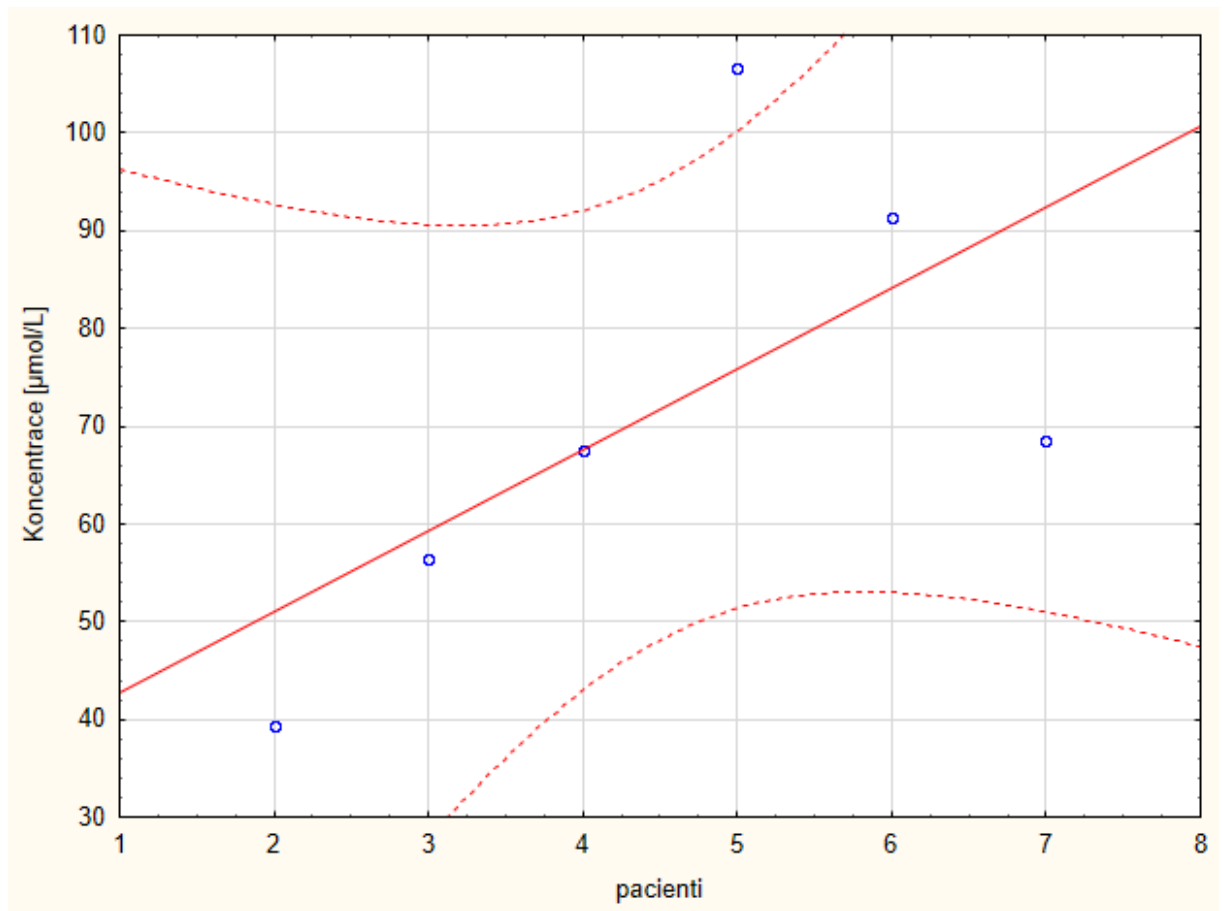
Graf 22: Koncentrace ω-3 mastných kyselin ve frakci CE.

4.2.7 Základní ukazatele X-ALD ve frakci PL



Graf 23: Porovnání průměrných hodnot koncentrací nasycených a ω-9 mononenasycených kyselin u mírně a středně nemocných pacientů a kontrol.

4.2.8 Kyselina nervonová



Graf 24: Závislost růstu kyseliny nervonové na stupni onemocnění ve frakci PL.

5 DISKUZE

Adrenoleukodystrofie je velmi vzácné, ale vážné onemocnění. Výskyt této choroby je 1-5:100 000, i když v současnosti dochází ke zvýšení počtu díky diagnostickým metodám.

Adrenoleukodystrofie je způsobená defektem metabolismu lipidů, konkrétně poruchou β -oxidace VLCFA v peroxizomech. Příčina poruchy je mutace genu ABCD1, který kóduje ALDP. ALDP fyziologicky zprostředkovává transport VLCFA přes peroxizomální membránu. Dochází k nedostatečnému odbourávání VLCFA, ty se poté akumulují ve tkáních (mozek, nadledviny) a tělních tekutinách. Akumulace VLCFA má toxický účinek na cílové tkáně, protože dochází k destabilizaci struktury a funkce membrán i organel buněk [39, 56, 90, 110].

X-ALD se diagnostikuje pomocí zobrazovacích technik (MR, CT), neurofyziologickými a biochemickými vyšetřeními (stanovení zvýšené koncentrace VLCFA v plazmě) a molekulárně-genetickými analýzami (vymezení mutace ABCD1 genu). Koncentrace VLCFA se stanovuje převážně plynovou chromatografií. Velmi podstatné pro včasné zachycení přenašečky je prenatální diagnostika a novorozenecký screening. Jestliže se onemocnění neodhalilo už prenatálně, díky novorozeneckému screeningu, může být ihned nasazena léčba a šance na přežití je vyšší [56].

Obdobnou problematikou se zabývala ve své diplomové práci Mgr. Martina Žmolilová, která studovala tři sourozence postižené těžkou formou X-ALD, kteří zřejmě před dovršením 20 let života zemřou, což je příkladem velmi vážné rodinné tragédie [132]. Proto je nezbytné i přes malou incidenci této nemoci, co možná nejvíce zabránit těmto fatálním následkům. Hlavní cestu spatřujeme v časném záchytu jak nemocných, tak i přenašečů, kterými jsou hlavně matky. To je podmíněno zlepšením a modernizací diagnostiky, která je stále původní a nezměnila se již 30 let, i když první případ adrenoleukodystrofie se objevil už na začátku 19. století [58,66].

Zaměřili jsme se proto na nalezení diagnostických markerů charakterizující časně stadium nemoci, kdy ještě postižení jaterních peroxizomů není tak průkazné. Nejprve jsme se snažili o zjištění, zda nedochází ke kumulaci signálních kyselin C22 – C26 v některé lipidové frakci plazmy, což by umožnilo přesnější diagnostiku. Zjistili jsme pouze hromadění těchto kyselin ve frakcích PL, DG, CE. Diagnosticky je tento nálezn nevyužitelný, protože nedochází k významnému zpřesnění diagnostických hodnot.

V dalším výzkumu jsme se zaměřili na podrobnější studium aktivit enzymů regulujících syntézu nenasycených mastných kyselin včetně esenciálních. Zde jsme našli významné snížení aktivity elongázy a $\Delta 6$ -desaturázy v plazmě a ve frakci DG a podstatné zvýšení de novo lipogeneze v plazmě a ve frakci PL. Tyto nálezy jsme ještě dokumentovali průměrnými hodnotami uvedenými v grafech č. 11-14 a v tabulkách č. 12 – 14 v příloze. Tyto změny aktivitních indexů se projeví v lipidogramu esenciálních mastných kyselin významnými disproporcemi. Nalezli jsme změny v poměru koncentrací ω -6 a ω -3 mastných kyselin, kde koncentrace ω -6 MK u pacientů byly mírně zvýšené oproti kontrolám, zatímco koncentrace ω -3 MK se snížila o 25 %. Poměr ω -6/ ω -3 MK u pacientů činí 1:11 oproti 1:7 u kontrol. To způsobuje negativní působení ω -6 metabolitů, které mají prozánětlivý a agregační účinek, fyziologicky se to u pacientů projevuje podporou demyelinizace a zvýšenou citlivostí k zánětlivým procesům. Stejně závislosti mezi ω -6 a ω -3 MK jsme našli i ve frakci PL, které jsou hlavní složkou membrán a jejich poměr vlastnosti membrán významně mění. Usuzujeme, že tyto změny mohou mít na průběh nemoci větší vliv, než je uváděno v některých pracích [133]. Proto jako další biochemický marker může být využit poměr ω -6/ ω -3 MK a to jeho zvýšená hodnota v plazmě.

Dalším zajímavým nálezem je zjištění, že u nemocných dochází ke značnému snížení obsahu všech esenciálních mastných kyselin ve frakci DG. Přestože je tato frakce minoritní a její fyziologický význam není podstatný, je tento nálezn opět možné využít diagnosticky, což dokládají grafy č. 19 a 20. Vymizení esenciálních mastných kyselin ve frakci DG nebylo doposud popsáno a důvod tohoto nálezů bude nutné ještě prostudovat.

Dále jsme se věnovali prostudování zastoupení nasycených a mononenasycených mastných kyselin ve frakci PL, která zobrazuje zastoupení těchto MK v buněčných membránách. Oproti mírnému poklesu ω -3 MK byl zde nalezen podstatný nárůst nasycených i nenasycených MK v této frakci, který i koreloval s progresí X-ALD. Nejvyšší nárůst, na dvojnásobek u mírně a na trojnásobek u středně nemocných byl nalezen u kyseliny palmitové, která je cytotoxická a její škodlivost byla prokázána u nemocných metabolickým syndromem, diabetem a u kardiovaskulárních nemocí [134]. Je pravděpodobné, že její zvýšená koncentrace může vyvolat toxický efekt v mozkových neuronech nemocných X-ALD, rovněž tento nálezn nebyl doposud popsán. Graf č. 23 zobrazuje i zvýšenou koncentraci kyseliny nervonové u středně nemocných pacientů a graf č. 24 dokládá její korelaci nárůstu s progresí nemoci. Jak uvádí nejnovější studie japonských autorů z letošního roku je kyselina nervonová potencionálním biomarkerem pro nemocí spojené s výskytem deprese, což zahrnuje i X-ALD. Je tedy možné kyselinu nervonovou zahrnout mezi testované

biomarkery, které se vyskytují u prvozáchtových pacientů a její nárůst je spojen i s nárůstem nasycených mononenasycených mastných kyselin (C14, C16, C18).

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme se zabývali diagnostikou adrenoleukodystrofie pomocí plynové chromatografie. Zpracovali jsme vzorky sedmi nemocných pacientů v počátečních stádiích onemocnění. Referenční hodnoty byly získány od deseti zdravých dárců obdobného věkového složení, kteří byli označeni jako kontrolní skupina. Všechny vzorky plazmy jsme rozdělili pomocí tenkovrstvé chromatografie do pěti lipidových frakcí. Po derivatizaci MK na methylestery MK jsme k analýze použili plynovou chromatografii s FID detektorem. Tím jsme zjistili celkové koncentrace mastných kyselin v plazmě i ve všech lipidových frakcích. Hodnoty byly statisticky zpracovány v Microsoft Office Excel 2016 a Statistica 12.

Cílem práce bylo stanovení hladin mastných kyselin v plazmě a ve všech lipidových frakcích plazmy a nalezení významných rozdílů mezi hodnotami u pacientů a kontrol. Tyto významné rozdíly jsme našli v poměru koncentrací ω -6 a ω -3 mastných kyselin, který u pacientů činí 1:11 oproti 1:7 u kontrol. Tento normální poměr je nezbytný pro udržení správné funkce mozku. Nalezený relativní nadbytek ω -6 MK ve frakci PL podporuje demyelinizaci a zvyšuje citlivost k zánětlivým procesům. Poměr esenciálních MK v plazmě a ve frakci PL může být využit jako biochemický marker onemocnění X-ALD.

Dále jsme zjistili značné snížení obsahu všech esenciálních mastných kyselin ve frakci DG. I tento nálezn je opět možné využít diagnosticky. Vymizení esenciálních mastných kyselin ve frakci DG nebylo doposud u nemocných X-ALD popsáno, a proto bude nutné jeho diagnostické využití ještě dále studovat.

Dále jsme se zaměřili na prostudování hladin nasycených a mononenasycených mastných kyselin. Nalezli jsme výrazný nárůst kyseliny palmitové, který koreloval s progresí X-ALD. Její zvýšená koncentrace může vyvolat toxický efekt v mozkových neuronech nemocných X-ALD, rovněž tento nálezn nebyl doposud popsán. Jak již bylo uvedeno, kyselina nervonová je potencionálním biomarkerem pro nemocí spojené s výskytem deprese, což zahrnuje i X-ALD. Proto jsme kyselinu nervonovou zahrnuli mezi perspektivní diagnostické biomarkery, protože její nárůst je spojen i s progresí onemocnění X-ALD.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TVRZICKA, Eva, Lefkothea-Stella KREMMYDA, Barbora STANKOVA a Ales ZAK. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review part 1. *Biomedical Papers* [online]. 2011, **155**(2): 117-130 [cit. 2015-10-24]. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2011.038.html>. ISSN 1213-8118.
- [2] DOSTÁLOVÁ, J. Fats in food and their nutritional evaluation. *Interní medicína pro praxi*. 2011; roc. 13, c. 9, s. 347 – 349.
- [3] The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 14th ed. Edited by Maryadele J. O'Neil (Editor), Patricia E. Heckelman (Senior Associate Editor), Cherie B. Koch (Associate Editor), and Kristin J. Roman (Assistant Editor). Merck and Co., Inc. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2007, **129**(7), 2197-2197 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1021/ja069838y. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja069838y>
- [4] DLOUHÝ, P., ANDĚL, M. Jak se mění pohled na tuky ve výživě. *Interní medicína pro praxi*. 2009; roč. 11, č. 12, s. 549 – 551.
- [5] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006. ISBN 8024715627.
- [6] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergens (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal* 2010;8:1461.
- [7] ŽÁK, Aleš a Jaroslav MACÁŠEK. *Ateroskleróza: nové pohledy*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3052-3.
- [8] CALDER PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*. 2003;38:343-52.
- [9] RUZICKOVA, Jana, Martin ROSSMEISL, Tomas PRAZAK, et al. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* [online]. 2004, **39**(12), 1177-1185 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1007/s11745-004-1345-9. ISSN 0024-4201. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11745-004-1345-9>

- [10] ROSSMEISL, Martin, Zuzana MACEK JILKOVA, Ondrej KUDA, et al. Metabolic Effects of n-3 PUFA as Phospholipids Are Superior to Triglycerides in Mice Fed a High-Fat Diet: Possible Role of Endocannabinoids. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(6), e38834- [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0038834. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0038834>
- [11] VAN ENGEN, Catherine E., Rob OFMAN, Inge M.E. DIJKSTRA, et al. CYP4F2 affects phenotypic outcome in adrenoleukodystrophy by modulating the clearance of very long-chain fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2016, **1862**(10), 1861-1870 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.07.006. ISSN 09254439. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092544391630166>
- [12] STAELS B. The PPAR System and Regulation of Lipoprotein Metabolism. In: Betteridge DJ, editor. *Lipids and vascular disease*. London: Martin Dunitz Publ; 2000. p. 27-37.
- [13] SCHOONJANS K, MARTIN G, STAELS B, AUWERX J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:159-66.
- [14] PINEDA-TORRA, I, GERVOIS P, STAELS B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:151-9.
- [15] XUE, Xi, Charles Y. FENG, Stefanie M. HIXSON, Kim JOHNSTONE, Derek M. ANDERSON, Christopher C. PARRISH a Matthew L. RISE. Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2014, **175**, 9-22 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.cbpb.2014.06.005. ISSN 10964959. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495914000797>
- [16] XIE, Dizhi, Fang CHEN, Siyuan LIN, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the euryhaline herbivorous teleost *Scatophagus argus*: Functional characterization, tissue expression and nutritional regulation of two fatty acyl elongases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2016, **198**, 37-45 [cit. 2018-04-30]. DOI:

- 10.1016/j.cbpb.2016.03.009. ISSN 10964959. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495916300343>
- [17] JIN, Min, Óscar MONROIG, Juan Carlos NAVARRO, Douglas R. TOCHER a Qi-Cun ZHOU. Molecular and functional characterisation of two elov14 elongases involved in the biosynthesis of very long-chain (> C 24) polyunsaturated fatty acids in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2017, **212**, 41-50 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.cbpb.2017.06.008. ISSN 10964959. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495917300787>
- [18] MORUNO-MANCHON, Jose F., Ndidi-Ese UZOR, Shelli R. KESLER, et al. Peroxisomes contribute to oxidative stress in neurons during doxorubicin-based chemotherapy. *Molecular and Cellular Neuroscience* [online]. 2018, **86**, 65-71 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.mcn.2017.11.014. ISSN 10447431. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743117301197>
- [19] DI CARA, Francesca, Avinash SHESHACHALAM, Nancy E. BRAVERMAN, Richard A. RACHUBINSKI a Andrew J. SIMMONDS. Peroxisome-Mediated Metabolism Is Required for Immune Response to Microbial Infection. *Immunity* [online]. 2017, **47**(1), 93-106.e7 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.06.016. ISSN 10747613. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317302765>
- [20] ANEZ-BUSTILLOS, Lorenzo, Duy T. DAO, Gillian L. FELL, Meredith A. BAKER, Kathleen M. GURA, Bruce R. BISTRIAN a Mark PUDER. Redefining essential fatty acids in the era of novel intravenous lipid emulsions. *Clinical Nutrition* [online]. 2018, **37**(3), 784-789 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.07.004. ISSN 02615614. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561417302431>
- [21] KANG, Joohyun, Jiyoun PARK, Hyunju CHOI, Bo BURLA, Tobias KRETZSCHMAR, Youngsook LEE a Enrico MARTINOIA. Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book* [online]. 2011, **9**, e0153- [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1199/tab.0153. ISSN 1543-8120. Dostupné z: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0153>
- [22] MATSUDA, Shuichi, Sho TAKANO, Moeko SATO, et al. Rice Stomatal Closure Requires Guard Cell Plasma Membrane ATP-Binding Cassette Transporter RCN1/OsABCG5. *Molecular Plant* [online]. 2016, **9**(3), 417-427 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/j.molp.2015.12.007. ISSN 16742052. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205215004608>

- [23] HIGGINS, C F. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology* [online]. 1992, **8**(1), 67-113 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1146/annurev.cb.08.110192.000435. ISSN 0743-4634. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>
- [24] CALDARI-TORRES, Cristina, Michael L. MCGILLIARD a Benjamin A. CORL. Esterification of essential and non-essential fatty acids into distinct lipid classes in ruminant and non-ruminant tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2016, **200**, 1-5 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.cbpb.2016.04.009. ISSN 10964959. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495916300434>
- [25] BABIREKERE-IRISO, Esther, Lotte LAURITZEN, Charlotte Gylling MORTENSEN, et al. Essential fatty acid composition and correlates in children with severe acute malnutrition. *Clinical Nutrition ESPEN* [online]. 2016, **11**, e40-e46 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.clnesp.2015.12.001. ISSN 24054577. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405457715001497>
- [26] MARGONI, M., F. SOLI, A. SANGALLI, M. BELLIZZI, E. CECCHINI a M. BUGANZA. A novel mutation in ABCD1 unveils different clinical phenotypes in a family with adrenoleukodystrophy. *Journal of Clinical Neuroscience* [online]. 2017, **43**, 175-177 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.jocn.2017.05.025. ISSN 09675868. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586817304137>
- [27] TURCO, Emanuela C., Francesca ORMITTI, Anna ANDREOLLI, Marina BARSACCHI, Carlotta FACINI a Francesco PISANI. A novel temporal pattern of childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain and Development* [online]. 2018, **40**(3), 238-241 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.braindev.2017.10.005. ISSN 03877604. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760417302711>
- [28] SOŠKA, V. *Poruchy metabolismu lipidů: diagnostika a léčba*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0234-7.
- [29] DRUGA, Rastislav, Miloš GRIM a Petr DUBOVÝ. *Anatomie centrálního nervového systému*. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-706-6.
- [30] WEBER, Alexander Mark, Carlos TORRES a Alexander RAUSCHER. Imaging the Role of Myelin in Concussion. *Neuroimaging Clinics of North America* [online]. 2018, **28**(1), 83-90 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.nic.2017.09.005. ISSN 10525149. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1052514917301132>

- [31] ALD. *The myelin project* [online]. USA, 2015 [cit. 2015-10-24]. Dostupné z: <http://www.myelin.org/ald.html>.
- [32] INOUE, Hideyo a Daniel A. KIRSCHNER. Evolution of myelin ultrastructure and the major structural myelin proteins. *Brain Research* [online]. 2016, **1641**, 43-63 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.10.037. ISSN 00068993. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899315008082>
- [33] WANG, Yan-Qin, Han CHEN, Wu-Ping ZHUANG a Hong-Lei LI. The clinical features of combined central and peripheral demyelination in Chinese patients. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2018, **317**, 32-36 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2018.02.006. ISSN 01655728. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572817305167>
- [34] RESNICK, Jesse M., Gabrielle E. O'BRIEN a Jay T. RUBINSTEIN. Simulated auditory nerve axon demyelination alters sensitivity and response timing to extracellular stimulation. *Hearing Research*[online]. 2018, **361**, 121-137 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.heares.2018.01.014. ISSN 03785955. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378595517304288>
- [35] TAN, Edwin C.K., Kristina JOHNELL, Sara GARCIA-PTACEK, Miriam L. HAAKSMA, Johan FASTBOM, J. Simon BELL a Maria ERIKSDOTTER. Acetylcholinesterase inhibitors and risk of stroke and death in people with dementia. *Alzheimer's & Dementia* [online]. 2018, , - [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.jalz.2018.02.011. ISSN 15525260. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526018300657>
- [36] SANCHEZ, Maria A., Genevieve M. SULLIVAN a Regina C. ARMSTRONG. Genetic detection of Sonic hedgehog (Shh) expression and cellular response in the progression of acute through chronic demyelination and remyelination. *Neurobiology of Disease* [online]. 2018, **115**, 145-156 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.04.003. ISSN 09699961. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996118301098>
- [37] KÁŠ, Svatopluk. *Neurologie v běžné lékařské praxi*. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-7169-339-1.
- [38] What is Leukodystrophy. *United leukodystrophy foundation* [online]. 2015 [cit. 2015-10-24]. Dostupné z: <http://ulf.org/what-is-leukodystrophy>.
- [39] AMBLER, Zdeněk, Josef BEDNAŘÍK a Evžen RŮŽIČKA. *Klinická neurologie*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2008-. ISBN 978-80-7387-157-4.

- [40] GAESSER, Jenna M. a Sharyl L. FYFFE-MARICICH. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS. *Experimental Neurology* [online]. 2016, **283**, 501-511 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.03.008. ISSN 00144886. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488616300516>
- [41] MATÍAS-GUÍU, J., C. OREJA-GUEVARA, J.A. MATIAS-GUIU a U. GOMEZ-PINEDO. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurología (English Edition)* [online]. 2018, **33**(3), 177-186 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.nrleng.2016.05.010. ISSN 21735808. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173580818300117>
- [42] CRAWFORD, A.H., C. CHAMBERS a R.J.M. FRANKLIN. Remyelination: The True Regeneration of the Central Nervous System. *Journal of Comparative Pathology* [online]. 2013, **149**(2-3), 242-254 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.jcpa.2013.05.004. ISSN 00219975. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997513000856>
- [43] PARISI, Laura R., Nasi LI a G. Ekin ATILLA-GOKCUMEN. Very Long Chain Fatty Acids Are Functionally Involved in Necroptosis. *Cell Chemical Biology* [online]. 2017, **24**(12), 1445-1454.e8 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.08.026. ISSN 24519456. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2451945617303240>
- [44] TAKASHIMA, Shigeo, Kayoko TOYOSHI, Takahiro ITOH, et al. Detection of unusual very-long-chain fatty acid and ether lipid derivatives in the fibroblasts and plasma of patients with peroxisomal diseases using liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2017, **120**(3), 255-268 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.12.013. ISSN 10967192. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719216301809>.
- [45] WANDERS, Ronald J.A. Peroxisomal disorders: Improved laboratory diagnosis, new defects and the complicated route to treatment. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2018,, - [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.mcp.2018.02.001. ISSN 08908508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890850818300331>
- [46] HERZOG, Katharina, Henk VAN LENTHE, Ronald J.A. WANDERS, Frédéric M. VAZ, Hans R. WATERHAM a Sacha FERDINANDUSSE. Identification and diagnostic value of phytanoyl- and pristanoyl-carnitine in plasma from patients with peroxisomal disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2017, **121**(3), 279-

- 282 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2017.05.003. ISSN 10967192. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719217302378>.
- [47] SCOTT, Camilla a Simon OLPIN. Peroxisomal disorders. *Paediatrics and Child Health* [online]. 2015, **25**(3), 119-122 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.paed.2014.11.001. ISSN 17517222. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751722214002546>.
- [48] FIDALEO, Marco. Peroxisomes and peroxisomal disorders: The main facts. *Experimental and Toxicologic Pathology* [online]. 2010, **62**(6), 615-625 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.etp.2009.08.008. ISSN 09402993. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0940299309002358>.
- [49] RAYMOND, Gerald V., Kristin W. BARAÑANO a S. Ali FATEMI. Peroxisomal Disorders. *Swaiman's Pediatric Neurology* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 347-354 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/B978-0-323-37101-8.00043-6. ISBN 9780323371018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323371018000436>
- [50] CIPOLLA, Cynthia M. a Irfan J. LODHI. Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2017, **28**(4), 297-308 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.tem.2016.12.003. ISSN 10432760. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276016301722..>
- [51] WANDERS, Ronald J.A. Peroxisomal disorders: Improved laboratory diagnosis, new defects and the complicated route to treatment. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2018, , - [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.mcp.2018.02.001. ISSN 08908508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890850818300331>.
- [52] WIERZBICKI, A.S. Refsum Disease- a Disorder of Peroxisomal Alpha-oxidation. *Encyclopedia of Movement Disorders* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 21-25 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374105-9.00191-X. ISBN 9780123741059. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012374105900191X>
- [53] LÜSEBRINK, Natalia, Luciana PORTO, Hans R. WATERHAM, Sacha FERDINANDUSSE, Hendrik ROSEWICH, Gerd KURLEMANN a Matthias KIESLICH. Absence of biochemical evidence at an early age delays diagnosis in a patient with a clinically severe peroxisomal biogenesis disorder. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. 2016, **20**(2), 331-335 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.ejpn.2015.11.008. ISSN 10903798. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090379815001919>

- [54] BURTMAN, Elizabeth a Molly O. REGELMANN. Endocrine Dysfunction in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* [online]. 2016, **45**(2), 295-309 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.ecl.2016.01.003. ISSN 08898529. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889852916300020>
- [55] TURCO, Emanuela C., Francesca ORMITTI, Anna ANDREOLLI, Marina BARSACCHI, Carlotta FACINI a Francesco PISANI. A novel temporal pattern of childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain and Development* [online]. 2018, **40**(3), 238-241 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.braindev.2017.10.005. ISSN 03877604. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760417302711>
- [56] PERCY, A.K. Adrenoleukodystrophy. *Encyclopedia of the Neurological Sciences* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 65-66 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-385157-4.00086-5. ISBN 9780123851581. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123851574000865>.
- [57] SON, Daryeon, Zhejiu QUAN, Phil Jun KANG, Gyuman PARK, Hoon-Chul KANG a Seungkwon YOU. Generation of two induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) patients with adrenomyeloneuropathy (AMN). *Stem Cell Research*[online]. 2017, **25**, 46-49 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.scr.2017.10.003. ISSN 18735061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506117302052>
- [58] PAVLAKIS, Steven G. New insights into adrenoleukodystrophy. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. 2017, **21**(4), 597- [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.ejpn.2017.05.002. ISSN 10903798. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090379817316203>
- [59] WIESINGER, Christoph, Markus KUNZE, Günther REGELSBERGER, Sonja FORSS-PETTER a Johannes BERGER. Impaired Very Long-chain Acyl-CoA β -Oxidation in Human X-linked Adrenoleukodystrophy Fibroblasts Is a Direct Consequence of ABCD1 Transporter Dysfunction. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2013, **288**(26), 19269-19279 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1074/jbc.M112.445445. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.445445>
- [60] VAN DE BEEK, Malu-Clair, Rob OFMAN, Inge DIJKSTRA, Frits WIJBURG, Marc ENGELLEN, Ronald WANDERS a Stephan KEMP. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*[online]. 2017, **1863**(9), 2255-2265 [cit. 2018-05-

- 01]. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.06.003. ISSN 09254439. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443917301989>
- [61] CHEN, Xiaoyan, Zhiye CHEN, Dehui HUANG, Xiaofeng LIU, Qiuping GUI a Shengyuan YU. Adult cerebral adrenoleukodystrophy and Addison's disease in a female carrier. *Gene* [online]. 2014, **544**(2), 248-251 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.gene.2014.04.056. ISSN 03781119. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111914004879>
- [62] FURUSHIMA, Wakana, Makiko KAGA, Masako NAKAMURA, Atsuko GUNJI a Masumi INAGAKI. Auditory agnosia as a clinical symptom of childhood adrenoleukodystrophy. *Brain and Development* [online]. 2015, **37**(7), 690-697 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.braindev.2014.10.011. ISSN 03877604. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760414002599>
- [63] YOU, Young Rang, Daryeon SON, Phil Jun KANG, Seungkwon YOU a Dae-Sung KIM. Generation of induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 21-year-old X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) patient. *Stem Cell Research* [online]. 2017, **25**, 136-138 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.scr.2017.10.016. ISSN 18735061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506117302192>
- [64] HJARTARSON, Helgi Thor, Christoffer EHRSTEDT a Kristina TEDROFF. Intrathecal baclofen treatment an option in X-linked adrenoleukodystrophy. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. 2018, **22**(1), 178-181 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.ejpn.2017.09.003. ISSN 10903798. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109037981731704X>
- [65] NURY, Thomas, Amira ZARROUK, Kévin RAGOT, Meryam DEBBABI, Jean-Marc RIEDINGER, Anne VEJUX, Patrick AUBOURG a Gérard LIZARD. 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: Potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2017, **169**, 123-136 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.037. ISSN 09600760. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076016300942>
- [66] WU, Chen, Takeo IWAMOTO, Junko IGARASHI, et al. Application of a diagnostic methodology by quantification of 26: 0 lysophosphatidylcholine in dried blood spots for Japanese newborn screening of X-linked adrenoleukodystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. 2017, **12**, 115-118 [cit. 2018-05-07]. DOI:

- 10.1016/j.ymgmr.2017.06.004. ISSN 22144269. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214426917300447ffff>
- [67] OUYANG, Qi, Xiaoying ZHOU, Jing CHEN, Juan DU, Guangxiu LU, Ge LIN a Yi SUN. Generation of human embryonic stem cells from abnormal blastocyst diagnosed with adrenoleukodystrophy. *Stem Cell Research* [online]. 2016, **17**(3), 634-636 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.scr.2016.11.003. ISSN 18735061. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506116301726>
- [68] FARRELL, Donald F. Neonatal Adrenoleukodystrophy: A Clinical, Pathologic, and Biochemical Study. *Pediatric Neurology* [online]. 2012, **47**(5), 330-336 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2012.07.006. ISSN 08878994. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899412003554>
- [69] ISRANI, Anil, Biswaroop CHAKRABARTY, Atin KUMAR a Sheffali GULATI. Isolated Frontal Variant of Adrenoleukodystrophy. *Pediatric Neurology* [online]. 2016, **54**, 100-101 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2015.08.003. ISSN 08878994. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088789941500380X>.
- [70] CHEN, Jing-Jing a Yun ZHENG. The value of the speech audiometry in diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Chronic Diseases and Translational Medicine* [online]. 2015, **1**(4), 243-244 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.cdtm.2015.11.003. ISSN 2095882X. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095882X15000699>
- [71] SERRA SOLER, Guillermo, María Soledad GOGORZA PÉREZ, Ana JIMÉNEZ PORTILLA a Vicente PEREG MACAZAGA. Primary adrenal insufficiency due to X-linked adrenoleukodystrophy diagnosed in adulthood. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed.)* [online]. 2017, **64**(8), 458-459 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.endien.2017.10.007. ISSN 25300180. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2530018017301415>
- [72] LÓPEZ-ERAUSKIN, Jone, Stéphane FOURCADE, Jorge GALINO, et al. Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Annals of Neurology* [online]. 2011, **70**(1), 84-92 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1002/ana.22363. ISSN 03645134. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.22363>
- [73] FOURCADE, Stéphane, Montserrat RUIZ, Cristina GUILERA et al. Valproic acid induces antioxidant effects in Xlinked adrenoleukodystrophy. *Human molecular genetics* [online]. 2008, **19**(10): 2005-2014 [cit. 2015-10-25]. Dostupné z:

- <http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2010/02/23/hmg.ddq082.short>. ISSN 0964-6906.
- [74] BERGER, Johannes, Christoph WIESINGER a Florian EICHLER. The genetic landscape of X-linked adrenoleukodystrophy: inheritance, mutations, modifier genes, and diagnosis. *The Application of Clinical Genetics* [online]. , 109- [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.2147/TACG.S49590. ISSN 1178-704X. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/the-genetic-landscape-of-x-linked-adrenoleukodystrophy-inheritance-mut-peer-reviewed-article-TACG>
- [75] JANGOUK, Parastoo, Kathleen M. ZACKOWSKI, Sakkubai NAIDU a Gerald V. RAYMOND. Adrenoleukodystrophy in female heterozygotes: Underrecognized and undertreated. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2012, **105**(2), 180-185 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.11.001. ISSN 10967192. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719211003970>
- [76] KUMAR, Ajay, Harry T. CHUGANI, Pulak CHAKRABORTY a A.H.M. Mahbul HUQ. Evaluation of Neuroinflammation in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Pediatric Neurology* [online]. 2011, **44**(2), 143-146 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2010.10.006. ISSN 08878994. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899410004455>
- [77] MOSER, Hugo W. Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *NeuroRX* [online]. 2006, **3**(2), 246-253 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.nurx.2006.01.004. ISSN 1545-5343. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1016/j.nurx.2006.01.004>
- [78] MARCHETTI, Desirée P., Bruna DONIDA, Helen T. DA ROSA, et al. Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *International Journal of Developmental Neuroscience* [online]. 2015, **43**, 8-15 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2015.03.004. ISSN 07365748. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736574815000325>
- [79] YAMADA, Hiroshi a Tatsuro IZUMI. Manifestation of Neurofibromatosis 1 in a Patient With X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Pediatric Neurology* [online]. 2009, **41**(3), 211-214 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2009.03.015. ISSN 08878994. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899409001611>
- [80] EICHLER, Florian a Patrick AUBOURG. Therapeutics of X-linked adrenoleukodystrophy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*[online].

- 2008, **5**(4), 237-242 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.ddstr.2009.04.002. ISSN 17406773. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740677309000126>
- [81] HÖFTBERGER, Romana, Markus KUNZE, Isabelle WEINHOFER, et al. Distribution and cellular localization of adrenoleukodystrophy protein in human tissues: Implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurobiology of Disease* [online]. 2007, **28**(2), 165-174 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.nbd.2007.07.007. ISSN 09699961. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996107001441>.
- [82] UNTERBERGER, Ursula, Günther REGELBERGER, Regina SUNDT, Hanno BERNHEIMER a Till VOIGTLÄNDER. Diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy in blood leukocytes. *Clinical Biochemistry* [online]. 2007, **40**(13-14), 1037-1044 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.04.015. ISSN 00099120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912007001828>
- [83] CAPPA, Marco. Clinical score for adrenoleukodystrophy patients candidate for bone marrow transplantation. *Paediatrics and Child Health* [online]. 2009, **19**, S214-S216 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.paed.2009.08.004. ISSN 17517222. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751722209002170>
- [84] LANDGRAF, P. Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the peroxisomal membrane by an internal region containing a highly conserved motif. *European Journal of Cell Biology* [online]. 2003, **82**(8), 401-410 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1078/0171-9335-00331. ISSN 01719335. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933504703118>
- [85] RIZZO, William B. X-Linked Adrenoleukodystrophy/Adrenomyeloneuropathy. *Encyclopedia of Endocrine Diseases* [online]. Elsevier, 2004, 2004, s. 689-693 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/B0-12-475570-4/00044-5. ISBN 9780124755703. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0124755704000445>
- [86] GUEUGNON, Fabien, Natalia VOLODINA, Jaoued Et TAOUIL, et al. A novel cell model to study the function of the adrenoleukodystrophy-related protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2006, **341**(1), 150-157 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.152. ISSN 0006291X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X05029293>.
- [87] BEAM, Donald, Michele D. POE, James M. PROVENZALE, et al. Outcomes of Unrelated Umbilical Cord Blood Transplantation for X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [online].

- 2007, **13**(6), 665-674 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.01.082. ISSN 10838791. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879107001437>
- [88] TORTORELLI, S., C. TURGEON, M. MAGERA et al. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy. *Annals of Neurology* [online]. 2012, **72**(16): 176 [cit. 2015-10-25]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.23705/abstract>. ISSN 1531-8249.
- [89] MCGUINNESS, M. Tumor necrosis factor- α and X-linked adrenoleukodystrophy. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 1995, **61**(2), 161-169 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/0165-5728(95)00084-F. ISSN 01655728. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016557289500084F>
- [90] MIIKE, Teruhisa, Keiichi TAKU, Toshiya TAMURA, et al. Clinical improvement of adrenoleukodystrophy following intravenous gammaglobulin therapy. *Brain and Development* [online]. 1989, **11**(2), 134-137 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/S0387-7604(89)80083-X. ISSN 03877604. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S038776048980083X>
- [91] VOGEL, B.H., S.E. BRADLEY, D.J. ADAMS, et al. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy in New York State: Diagnostic protocol, surveillance protocol and treatment guidelines. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2015, **114**(4), 599-603 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2015.02.002. ISSN 10967192. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719215000384>
- [92] Lorenzo-oil. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, 2013 [cit. 2015-10-25]. Dostupné z: file:///C:/Users/uzivatel/Downloads/F-CAU-013-12N-4vydani_Rozhodnuti_revize_b.pdf.
- [93] KURATSUBO, Izumi, Yasuyuki SUZUKI, Nobuyuki SHIMOZAWA a Naomi KONDO. Parents of childhood X-linked adrenoleukodystrophy: High risk for depression and neurosis. *Brain and Development*[online]. 2008, **30**(7), 477-482 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.braindev.2007.12.012. ISSN 03877604. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760408000041>
- [94] WANG, Ying, Rachel BUSIN, Catherine REEVES, et al. X-linked adrenoleukodystrophy: ABCD1 de novo mutations and mosaicism. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. 2011, **104**(1-2), 160-166 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.05.016. ISSN 10967192. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719211001685>

- [95] VAN GEEL, Björn M., Bwee Tien POLL-THE, Aad VERRIPS, Jaap-Jan BOELEN, Stephan KEMP a Marc ENGELEN. Hematopoietic cell transplantation does not prevent myelopathy in X-linked adrenoleukodystrophy: a retrospective study. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2015, **38**(2), 359-361 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s10545-014-9797-1. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-014-9797-1>
- [96] GALEA, Elena, Nathalie LAUNAY, Manuel PORTERO-OTIN, Montserrat RUIZ, Reinald PAMPLONA, Patrick AUBOURG, Isidre FERRER a Aurora PUJOL. Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2012, **1822**(9), 1475-1488 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.02.005. ISSN 09254439. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443912000336>
- [97] MILLER, W. P., S. M. ROTHMAN, D. NASCENE, et al. Outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for childhood cerebral adrenoleukodystrophy: the largest single-institution cohort report. *Blood* [online]. 2011, **118**(7), 1971-1978 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1182/blood-2011-01-329235. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-01-329235>
- [98] SAKAI, Shinya, Kazumi HIRAYAMA, Kaeko OGURA, Naoko SAKAI, Mutsuko SUDOH, Naoya MURATA a Syoichi IWASAKI. Visual function of a patient with advanced adrenoleukodystrophy: Comparison of luminance and color contrast sensitivities. *Brain and Development*[online]. 2008, **30**(1), 68-72 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/j.braindev.2007.06.002. ISSN 03877604. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760407001490>
- [99] KHAN, Mushfiquddin, Jaspreet SINGH, Anne G. GILG, Takuhiro UTO a Inderjit SINGH. Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy. *Journal of Lipid Research* [online]. 2010, **51**(7), 1685-1695 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1194/jlr.M002329. ISSN 0022-2275. Dostupné z: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M002329>
- [100] SESSA, Maria, Laura LORIOLI, Francesca FUMAGALLI, et al. Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet* [online]. 2016, **388**(10043), 476-487 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30374-9.

- [101] BRADBURY, Allison M., Mohammed A. RAFI, Jessica H. BAGEL, et al. AAVrh10 Gene Therapy Ameliorates Central and Peripheral Nervous System Disease in Canine Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease). *Human Gene Therapy* [online]. 2017, , - [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1089/hum.2017.151. ISSN 1043-0342. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2017.151>
- [102] BIFFI, Alessandra, Patrick AUBOURG a Nathalie CARTIER. Gene therapy for leukodystrophies. *Human molecular genetics* [online]. 2011, **20**(1): 42-53 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2011/03/31/hmg.ddr142.short>. ISSN 0964-6906.
- [103] BENHAMIDA, Sonia, Françoise PFLUMIO, Anne DUBART-KUPPERSCHMITT et al. Transduced CD34 cells from adrenoleukodystrophy patients with HIV-derived vector mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice. *Molecular therapy* [online]. 2003, **7**(3): 317-324 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668127>. ISSN 1525-0016.
- [104] Pioglitazone for the treatment of adrenoleukodystrophy. *European Medicines Agency* [online]. 2014 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2014/03/WC500164318.pdf.
- [105] SINGH, Inderjit a Aurora PUJOL. Pathomechanisms Underlying X-Adrenoleukodystrophy: A Three-Hit Hypothesis. *Brain Pathology*[online]. 2010, **20**(4), 838-844 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2010.00392.x. ISSN 10156305. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3639.2010.00392.x>
- [106] PAUL, David A., Leonard S. GOLDSMITH, Daniel K. MILES, Ann B. MOSER, Alfred J. SPIRO a Warren D. GROVER. Neonatal adrenoleukodystrophy presenting as infantile progressive spinal muscular atrophy. *Pediatric Neurology* [online]. 1993, **9**(6), 496-497 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1016/0887-8994(93)90034-A. ISSN 08878994. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/088789949390034A>
- [107] ROTONDI, Annalisa, Alessandra BENDINI, Lorenzo CERRETANI, Matteo MARI, Giovanni LERCKER a Tullia Gallina TOSCHI. Effect of Olive Ripening Degree on the Oxidative Stability and Organoleptic Properties of Cv. Nostrana di Brisighella Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(11), 3649-3654 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1021/jf049845a. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049845a>

- [108] MOSER, Hugo W., Gerald V. RAYMOND, Wolfgang KOEHLER, et al. Evaluation of the Preventive Effect of Glyceryl Trioleate-Triercucate (“Lorenzo’s Oil”) Therapy in X-Linked Adrenoleukodystrophy: Results of Two Concurrent Trials. ROELS, Frank, Myriam BAES a Sylvia DE BIE, ed. *Peroxisomal Disorders and Regulation of Genes* [online]. Boston, MA: Springer US, 2003, 2003, s. 369-387 [cit. 2018-04-29]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4419-9072-3_47. ISBN 978-1-4613-4782-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9072-3_47
- [109] KŘEHNÁČ, Vít. Adrenoleukodystrofie. *Alfabet* [online]. 2014 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://www.alfabet.cz/informace-o-typech-zdravotniho-postizeni/diagnozy/15-adrenoleukodystrofie>.
- [110] DVOŘÁKOVÁ, L., M. HŘEBÍČEK, H. JAHNOVÁ et al. X-vázaná adrenoleukodystrofie u jednadvaceti českých pacientů. *Česko-slovenská pediatrie* [online]. 2006, **61**(3): 129-136 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/cesko-slovenska-pediatrie-clanek/x-vazana-adrenoleukodystrofie-u-jednadvaceti-ceskych-pacientu-4522>. ISSN 1805-4501.
- [111] VÁVROVÁ, Jaroslava. Chromatografické metody. *Datový standard MZ ČR* [online]. 2006 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJAOF.htm>.
- [112] TVRZICKÁ, E. STANKOVÁ, B. VECKA, M. ŽÁK, A. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*. 2002; roč. 465, č. 1 - 2, s. 337 – 350.
- [113] GUPTA, Vinod Kumar, Hadi KHANI, Behzad AHMADI-ROUDI, Shima MIRAKHORLI, Ehsan FERAYDUNI a Shilpi AGARWAL. Prediction of capillary gas chromatographic retention times of fatty acid methyl esters in human blood using MLR, PLS and back-propagation artificial neural networks. *Talanta* [online]. 2011, **83**(3), 1014-1022 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.11.017. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914010008775>
- [114] GONZÁLEZ, Oskar, María Encarnación BLANCO, Gorka IRIARTE, Luis BARTOLOMÉ, Miren Itxaso MAGUREGUI a Rosa M. ALONSO. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1353**, 10-27 [cit. 2018-04-29].

- DOI: 10.1016/j.chroma.2014.03.077. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314005299>
- [115] RICHTR, Václav a Milan KRAITR. Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie. *Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni* [online]. 2004 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: https://fpe.zcu.cz/kch/dokumenty/Priloha_III.pdf.
- [116] SHERMA, Joseph a Bernard FRIED. *Handbook of thin-layer chromatography*. 3. vyd. New York: Marcel Dekker, 2003, 1331 s. ISBN 0-8247-0895-4.
- [117] COUFAL, Pavel. Planární (plošná) chromatografie. *Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy* [online]. 1996 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>.
- [118] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [119] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [120] HAWKEY, Elizabeth a Joel T. NIGG. Omega–3 fatty acid and ADHD: Blood level analysis and meta-analytic extension of supplementation trials. *Clinical Psychology Review* [online]. 2014, **34**(6), 496-505 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.cpr.2014.05.005. ISSN 02727358. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272735814000749>
- [121] ŠTULÍK, Karel. Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek. *VŠCHT Praha* [online] Praha, 2006 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf>.
- [122] FEKETE, K., E. GYÖREI, S. LOHNER, E. VERDUCI, C. AGOSTONI a T. DECSI. Long-chain polyunsaturated fatty acid status in obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews* [online]. 2015, **16**(6), 488-497 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1111/obr.12280. ISSN 14677881. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/obr.12280>
- [123] FAN, Hui, Jonathan SMUTS, Ling BAI, Phillip WALSH, Daniel W. ARMSTRONG a Kevin A. SCHUG. Gas chromatography–vacuum ultraviolet spectroscopy for analysis of fatty acid methyl esters. *Food Chemistry* [online]. 2016, **194**, 265-271 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.004. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615011875>
- [124] Struktura a funkce mastných kyselin. *Institut Galenus* [online]. [cit. 2016-02-19]. Dostupné z: <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-lipidy-mastne-kyseliny>.

- [125] FEKETE, K., E. GYÖREI, S. LOHNER, E. VERDUCI, C. AGOSTONI a T. DECSI. Long-chain polyunsaturated fatty acid status in obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews* [online]. 2015, **16**(6), 488-497 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1111/obr.12280. ISSN 14677881. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/obr.12280>
- [126] CHANG, CY, DS KE a JY CHEN. Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurol Taiwan* [online]. 2009, **18**(4): 231-241 [cit. 2016-02-19]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20329590>. ISSN 1028-768X.
- [127] VAN ELST, Kim, Hilgo BRUINING, Barbara BIRTOLI, Christian TERREAUX, Jan K. BUITELAAR a Martien J. KAS. Food for thought: Dietary changes in essential fatty acid ratios and the increase in autism spectrum disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*[online]. 2014, **45**, 369-378 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.004. ISSN 01497634. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763414001687>
- [128] IGAL, R. A. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* [online]. 2010, **31**(9), 1509-1515 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1093/carcin/bgq131. ISSN 0143-3334. Dostupné z: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgq131>
- [129] KUHN, F.T., M.E. BÜRGER a V.T. DIAS. Brain incorporation of different polyunsaturated fatty acids ratio and anxiety-like symptoms development in young rats supplemented with omega-3/-6. *European Neuropsychopharmacology* [online]. 2017, **27**, S1010-S1011 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1016/S0924-977X(17)31773-X. ISSN 0924977X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X1731773X>
- [130] MOZAFFARIAN, Dariush a Jason H.Y. WU. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*[online]. 2011, **58**(20), 2047-2067 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.06.063. ISSN 07351097. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109711031317>
- [131] GONG, Yi, Dakai MU, Shilpa PRABHAKAR, et al. Adenoassociated Virus Serotype 9-Mediated Gene Therapy for X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Molecular Therapy* [online]. 2015, **23**(5), 824-834 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1038/mt.2015.6. ISSN 15250016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001616301071>.

- [132] ŽMOLILOVÁ, Martina. *Diagnostika adrenoleukodystrofie pomocí plynové chromatografie*. Pardubice, 2016. 123 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
- [133] KEMP, Stephan, Johannes BERGER a Patrick AUBOROURG. X-linked adrenoleukodystrophy: CLinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular basis of Disease*. 2012, 1822(9), 1465-1474.
- [134] MAEDLER, K., OBERHOLZER, J. BUCHER, P., et al. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β -cell turnover and function, *Diabetes*, 2003, vol. 52, no. 3, s. 726 – 733.

8 PŘÍLOHA

Tabulka 2: Rozdělení peroxizomálních poruch z [12].

Porucha	Zkratka	Postižený protein	Gen	Chromozom
Poruchy peroxizomální biogeneze				
Zellwegerův syndrom	ZS	Různé peroxiny včetně: Pex 1p, 2p, 3p, 5p, 6p, 10p, 12p, 13p, 14p, 16p, 19p, 26p	<i>PEX1, 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 16, 19, 26</i>	Více lokusů
Neonatální adrenoleukodystrofie	NALD			
Infantilní Refsumova choroba	IRD			
Rhizomelická chondrodysplasia punctata typ 1	RCDP Typ 1	Pex 7p	<i>PEX7</i>	6q22-q24
Jednotlivé deficity peroxizomálních enzymů				
X-vázaná adrenoleukodystrofie	X-ALD	ALDP	<i>ABCD1</i>	Xq28
Deficit acyl-CoA oxidázy (pseudo-neonatální ALD)	Deficit ACOX-1	Acyl-CoA oxidáza mastných kyselin s nevětvenými řetězci (SCOX/ACOX1)	<i>ACOX1</i>	17q25.1
Deficit D-bifunkčního proteinu	Deficit D-BP	D-BP/MF2/MFEII/D-PBE	<i>HSD17B4</i>	5q2
Deficit 2-metylacyl-CoA racemázy	Deficit racemázy	AMACR	<i>AMACR</i>	5q13.2-p.12
Rhizomelická chondrodysplasia punctata typ 2 (deficit DHAPAT)	RCDP typ 2	DHAPAT	<i>GNPAT</i>	1q42.1-42.3
Rhizomelická chondrodysplasia punctata typ 3 (deficit alkyl-DHAP syntázy)	RCDP typ 3	ADHAPS	<i>AGPS</i>	2q33
Refsumova choroba (deficit fytanoyl-CoA hydroxylázy)	ARD	Fytanoyl-CoA hydroxyláza	<i>PHYH / PAHX</i>	10p15-p14
Hyperoxalurie typ 1	PH1	Alaninglyoxylátaminotransferáza (AGT)	<i>AGXT</i>	2q37.3
Glutarová acidémie typ 3	GA3	?	?	?
Akatalasémie	-	Kataláza	<i>CAT</i>	11p13
MULIBREY nanismus	MUL	Trim37p	<i>TRIM</i>	17q22-23

Tabulka 3: Přesnost metody stanovení mastných kyselin – 1. část.

Přesnost	PL			DG			FFS			TG			CE		
	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]
Masťná kyselina															
12-Methyltridekanová	0,21	0,12	55,53	0,11	0,06	52,38	0,16	0,11	65,75	0,62	0,53	85,7	0,24	0,07	28,07
Myristová	10,47	3,91	37,32	3,66	1,35	36,91	14,04	7,35	52,38	94,4	71,71	75,97	24,05	8,41	34,97
13-Methyltridekanová	2,06	0,44	21,59	3,15	0,54	17,1	3,84	0,91	23,72	4,31	0,84	19,59	6,11	3,25	53,23
12-Methyltridekanová	0,26	0,07	27,81	0,21	0,08	37,46	0,58	0,39	67,47	3,23	3,21	99,1	0,46	0,23	50,1
Pentadekanová	5,95	1,49	25,14	1,18	0,43	36,99	2,48	1,08	43,53	12,99	7,39	56,93	5,49	2,01	36,54
Palmitová	556,42	1,30	23,36	44,83	14,59	32,55	113,89	51,27	45,01	661,04	415,82	62,9	210,1	47,91	22,8
Palmitolejová - trans	15,19	7,94	52,23	5,6	1,82	32,43	15,66	10,82	69,12	101,6	77,44	76,22	74,04	38,73	52,31
Sapie nová	1,93	0,69	35,78	0,65	0,16	24,79	0,61	0,33	54,53	3,52	2,14	60,7	2,17	0,93	42,79
Palmitolejová - cis	9,57	2,43	25,35	1,01	0,3	29,44	1,98	0,78	39,35	9,84	5,7	57,88	2,08	0,65	31,54
14-Methylhexadekanová	2,34	1,29	55,13	0,65	0,23	36,25	1,37	0,79	57,81	9,33	5,56	59,62	5,18	1,82	35,05
Heptadekanová	346,21	85,62	24,73	29,85	13,16	44,07	51,6	14,61	28,31	136,56	87,84	64,32	27,85	6,23	22,38
16-Methylheptadekanová	6,96	2,98	42,8	4,4	1,02	23,2	2,72	1,06	39,11	13,28	8,91	67,08	1,46	0,72	49,5
Stearová	224,26	61,86	27,59	67,5	11,54	17,1	130,66	74,22	56,8	960,78	580,77	60,45	364,92	103,77	28,44
Vacenová - trans	39,79	9,26	23,27	5,91	1,19	20,18	11,42	6,92	60,61	74,43	46,15	62,01	36,34	8,21	22,6
Olejová	510,4	127,01	24,89	35,58	12,38	34,8	68,36	34,93	51,1	477,48	405,4	84,91	1060,13	351,65	33,17
Vacenová	2,54	1,04	40,89	0,81	0,35	43,51	1,43	0,91	63,64	14,03	12,39	88,32	27,33	14,51	53,08
Nonadekanová	8,61	2,03	23,62	1,02	0,28	27,22	0,78	0,22	28,03	2,93	2,06	70,23	1,27	0,47	36,6
Linolová	0,21	0,12	55,53	2	0,53	26,49	6,1	5,63	92,33	28,26	30,24	107,01	10,51	5,24	49,87
γ-Linolenová	10,47	3,91	37,32	1,68	0,66	39,03	2,05	1,62	79,08	6,04	3,91	64,74	1,68	1,02	60,42
Arachová	2,06	0,44	21,59	6,97	4,43	63,52	4,38	2,22	50,8	18,04	17,96	99,57	29,08	12,37	42,54

Tabulka 4: Přesnost metody stanovení mastných kyselin – 2. část.

Přesnost	PL			DG			FFS			TG			CE		
	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]	Průměr [μmol/L]	SD [μmol/L]	CV [%]
Mastná kyselina															
α-Linolenová	4,63	1,9	41,08	0,11	0,06	54,55	4,35	0,67	15,51	7,77	0,91	11,66	7,21	0,6	8,38
Octadecadienová	3,43	1,99	57,96	3,66	1,35	36,89	9,93	0,62	6,26	5,58	0,76	13,65	4,49	0,36	7,94
Octadecadienová	149,21	61,42	41,17	3,15	0,54	17,14	1,55	0,37	23,57	0,85	0,16	19,29	1,93	0,26	13,51
Stearidonová	22,56	6,42	28,45	0,21	0,08	38,1	1,73	0,33	19,29	2,05	0,34	16,56	3,7	0,57	15,27
cis-8,11,14-Eikosatrienová	323,31	87,85	27,17	1,18	0,43	36,44	0,69	0,15	21,86	2,6	0,22	8,33	8,48	0,71	8,39
Behenová	2,98	1,64	55,25	44,83	14,59	32,55	0,79	0,11	14,3	0,6	0,09	15,55	0,82	0,08	10,3
Arachidonová	27,9	11,24	40,28	5,6	1,82	32,5	3,9	0,65	16,57	12,14	1,83	15,08	106,02	9,5	8,96
Eikosatetraenová	22,63	7,12	31,44	0,35	0,2	57,14	0,44	0,2	44,27	2,05	1,73	84	1,23	0,63	51,25
Eikosapentaenová	14,19	6,36	44,8	1,75	0,73	41,71	2,26	0,95	41,88	8,06	5,81	72,16	19,73	9,02	45,73
Lignocerová	61,56	15,82	25,7	1,95	0,68	34,87	0,9	0,28	31,49	1,38	0,87	63,38	0,48	0,15	32,08
Dokosatetraenová	6,19	2,53	40,89	1,1	0,49	44,55	2,2	0,84	38,24	8,6	6,2	72,12	8,34	5,01	60,14
Nervonová	10,94	3,42	31,21	3,26	1,04	31,9	1,82	0,59	32,44	1,94	0,78	39,93	2,71	1,56	57,52
Dokosapentaenová	116,2	40,25	34,64	1,13	0,59	52,21	0,87	0,81	92,59	2,93	1,68	57,09	0,9	0,46	51,15
Dokosapentaenová	0,14	0,08	56,22	0,53	0,32	60,38	0,73	0,29	39,82	4,14	2,76	66,85	0,82	0,32	39,13
Dokosahexaenová	4,63	1,9	41,08	7,94	2,06	25,94	14,9	4,96	33,3	24,73	17,29	69,94	58,52	18,52	31,65
Cerotová	3,43	1,99	57,96	1,15	0,08	6,96	0,1	0,09	86,71	0,09	0,1	109,75	0,16	0,1	58,86
Tetrakosatetraenová	0,25	2,03	23,62	0,21	0,12	57,14	0,15	0,04	23,65	2,05	1,73	84	0,08	0,02	20,41
Tetrakosapentaenová	0,13	0,12	55,53	0,6	0,04	6,67	0,06	0,01	24,86	0,05	0,01	19,36	0,74	0,13	17,11
Tetrakosapentaenová	0,21	3,91	37,32	0,7	0,06	8,57	0,09	0,02	20,75	0,12	0,02	17,77	0,24	0,05	22
Tetrakosahexaenová	0,24	0,44	21,59	0,11	0,03	27,27	0,11	0,02	19,57	0,14	0,03	21,49	0,12	0,03	21,79

Tabulka 6: Koncentrace mastných kyselin v plazmě a ve frakcích – 2. část.

PLAZMA		µmol/L																							
Mastná kyselina	Zkratka	4						5						5						6					
		PL	DG	FFS	TG	CE	Plazma	PL	DG	FFS	TG	CE	Plazma	PL	DG	FFS	TG	CE	Plazma	PL	DG	FFS	TG	CE	Plazma
12-Methyltridekanová	12M-C13:0	0,52	0,81	0,49	6,66	0,69	9,17	0,34	0,00	0,54	1,17	0,70	2,75	0,19	0,47	0,89	3,51	1,50	6,56	0,30	0,50	0,92	3,51	1,50	6,56
Myristová	C14:0	29,67	21,30	45,39	681,02	66,05	843,42	21,29	0,00	34,69	182,04	49,48	287,49	30,50	9,52	33,41	874,40	45,00	992,84	0,24	0,40	0,78	3,51	1,50	6,56
13-Methyltetradekanová	13M-C14:0	0,97	5,66	5,52	15,61	28,42	56,19	0,24	0,00	5,19	2,27	28,58	36,28	0,70	4,98	5,39	7,82	30,66	49,55	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
12-Methyltetradekanová	12M-C14:0	3,01	4,74	10,18	118,12	8,19	144,25	1,52	0,00	9,49	38,81	5,33	55,14	1,83	1,85	7,83	126,07	4,63	142,51	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Pentadekanová	C15:0	12,68	2,66	5,25	70,62	12,35	103,56	8,04	0,00	3,53	16,31	9,31	37,20	14,65	1,30	3,67	95,86	8,64	124,12	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Palmitová	C16:0	1393,38	101,57	243,27	3855,76	526,59	6120,57	1655,77	0,00	400,44	2062,10	663,84	4782,15	2710,29	95,44	332,28	10670,52	608,94	14417,48	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Palmitolejová - trans	9-C16:1-trans	0,04	0,12	0,05	0,37	0,30	0,88	0,04	0,00	0,02	0,15	0,07	0,27	0,03	0,02	0,04	0,26	0,59	0,95	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Saptenová	C16:1-N10	19,28	4,85	9,26	95,02	25,75	154,16	14,82	0,00	10,97	59,92	64,69	150,40	21,64	3,32	9,87	217,39	39,84	292,06	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Palmitolejová - cis	9-C16:1-cis	46,23	26,69	49,91	536,10	171,95	830,89	60,15	0,00	106,89	464,00	304,23	935,27	142,30	26,70	77,58	2080,56	442,29	2769,43	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
14-Methylheptadekanová	14M-C16:0	8,83	2,39	3,40	50,63	9,28	74,51	5,64	0,00	3,01	15,67	6,42	30,74	6,52	1,17	2,30	49,90	7,58	67,48	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Heptadekanová	C17:0	16,86	1,46	3,00	42,69	5,03	69,04	15,33	0,00	3,09	14,14	3,27	35,83	23,24	0,85	3,03	79,34	2,71	109,16	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
16-Methylheptadekanová	16M-C17:0	2,52	0,12	0,57	8,34	2,58	14,13	1,62	0,00	0,81	3,10	2,00	7,52	1,77	0,05	0,60	8,18	1,63	12,23	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Stearová	C18:0	537,50	24,20	58,06	567,90	47,80	1235,45	76,02	0,00	85,29	194,24	48,18	1093,73	1324,14	26,13	67,76	1076,46	38,72	2533,21	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Vaccenová - trans	C18:1-N7-trans	20,43	7,50	9,59	63,52	5,82	106,86	5,31	0,00	4,00	9,69	2,50	21,49	8,88	4,29	3,74	75,27	2,57	94,74	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
olejová	C18:1-N9	507,00	149,29	227,02	3294,67	651,24	4829,22	548,18	0,00	407,69	1837,26	871,02	3664,15	979,20	133,38	303,61	8752,46	967,07	11135,72	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Vaccenová	C18:1-N7-cis	67,28	10,79	16,58	209,82	47,08	351,55	79,34	0,00	38,43	175,59	62,45	355,81	124,33	12,09	27,61	585,35	59,06	808,43	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Nonadekanová	C19:0	3,99	0,77	1,74	19,44	4,15	30,10	2,65	0,00	1,01	3,68	1,91	9,25	1,00	0,72	1,00	19,42	2,74	27,74	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Linolová	C18:2-N6	600,75	24,47	70,22	761,74	983,54	2440,71	499,38	0,00	127,03	458,94	121,46	2302,82	962,56	24,24	88,08	1760,79	1282,86	4118,53	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
γ-Linolenová	C18:3-N6	4,71	0,53	2,62	30,42	29,28	67,56	9,14	0,00	5,31	38,95	72,56	125,97	22,85	1,22	5,82	108,28	107,52	245,68	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Arachová	C20:0	14,20	0,86	1,45	13,14	1,07	30,72	16,92	0,00	1,26	2,88	1,38	22,44	21,58	1,17	1,34	19,40	2,25	45,74	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
α-Linolenová	C18:3-N3	7,14	0,57	9,24	64,77	13,25	94,98	2,32	0,00	6,12	11,68	7,10	27,22	16,27	2,31	18,41	205,08	22,02	264,09	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Stearidonomová	C18:4-N3	4,18	0,54	1,72	12,12	1,54	20,10	6,40	0,00	1,36	6,42	1,67	15,86	9,10	0,67	4,74	37,92	4,81	57,24	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
cis-8,11,14-Eikosatrienová	C20:3-N6	62,19	0,46	1,25	9,98	7,11	80,99	135,79	0,00	3,13	10,62	23,69	173,24	189,80	0,57	1,67	33,76	23,95	249,74	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Behenová	C22:0	38,71	1,33	0,34	4,70	7,65	52,74	55,18	0,00	0,24	0,64	7,13	63,20	60,10	1,99	0,58	4,10	0,18	66,94	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Arachidonomová	C20:4-N6	195,65	1,33	8,18	43,94	57,25	306,35	403,65	0,00	2,102	36,39	195,97	657,03	609,32	2,69	10,41	181,66	226,72	1030,79	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Eikosatrienová	C20:4-N3	6,09	0,38	0,90	4,09	1,01	12,46	5,47	0,00	1,02	1,47	1,19	9,15	19,30	0,18	1,17	13,45	3,60	37,70	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Eikosapentaenová	C20:5-N3	23,45	0,57	2,42	8,74	7,41	42,59	15,02	0,00	3,11	2,75	8,88	29,77	93,02	1,69	4,37	48,87	42,98	190,93	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Lignocenová	C24:0	30,62	2,63	0,41	2,26	0,17	36,09	48,75	0,00	0,10	0,49	0,46	49,80	35,32	3,48	0,13	1,78	0,28	40,99	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Dokosatrienová	C22:4-N6	10,57	0,01	0,13	9,59	0,06	20,35	37,83	0,00	0,05	12,67	0,51	51,06	27,63	0,09	0,16	37,89	0,28	66,06	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Nervonová	C24:1-N9	67,62	1,52	0,45	1,67	0,26	71,53	106,73	0,00	0,58	0,35	0,26	108,11	91,40	2,47	0,44	2,41	1,10	97,82	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Dokosapentaenová	C22:5-N6	7,29	0,03	2,66	6,82	0,07	16,87	32,92	0,00	4,42	9,61	2,73	49,68	23,59	2,21	2,03	16,46	0,97	45,26	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Dokosapentaenová	C22:5-N3	14,38	0,01	1,05	8,71	0,08	24,23	19,36	0,00	1,34	4,93	0,91	26,54	46,67	0,08	1,53	34,95	0,74	83,97	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Dokosahexaenová	C22:6-N3	38,43	0,18	1,89	8,49	1,40	50,39	38,56	0,00	2,30	3,05	2,54	46,45	119,71	0,54	2,87	31,34	9,04	163,51	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Ceretová	C26:0	0,37	0,62	0,38	0,50	0,26	2,13	0,13	0,00	0,55	0,30	1,52	2,51	0,52	0,45	0,59	1,23	1,68	4,46	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Tetrakosatrienová	C24:4-N6	0,08	0,00	0,89	0,01	0,01	1,00	0,43	0,00	0,67	0,03	0,01	1,15	0,70	0,03	1,08	1,30	0,05	3,16	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Tetrakosapentaenová	C24:5-N6	0,30	0,07	2,83	0,88	0,19	4,28	2,86	0,00	2,73	0,90	2,55	9,05	2,22	1,98	2,14	1,78	0,26	8,38	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Tetrakosapentaenová	C24:5-N3	0,24	0,04	2,33	0,30	0,08	2,99	0,48	0,00	0,07	0,14	0,16	0,85	0,35	0,54	0,11	0,41	0,05	1,46	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95
Tetrakosahexaenová	C24:6-N3	1,55	1,45	1,26	1,39	3,04	8,68	2,03	0,00	0,77	1,38	2,71	6,90	3,72	0,49	0,57	1,46	0,08	6,32	0,04	0,06	0,12	0,26	0,59	0,95

Tabulka 8: Aktivitní koeficienty lipogenních enzymů pacientů a kontrol v plazmě

Enzym	1	2	3	4	5	6	7	kontroly
Δ -9 desaturáza	3,39	3,45	2,70	3,91	3,35	4,40	2,36	2,89
elongáza*	2,31	2,13	2,65	2,02	2,29	1,76	3,01	3,81
Δ -5 desaturáza	3,48	4,42	6,34	3,78	3,79	4,13	5,55	2,83
Δ -6 desaturáza	3,40	2,52	2,67	3,32	7,52	6,06	1,55	9,65
de novo lipogeneze*	21,10	13,38	11,85	25,14	20,88	35,06	8,62	7,45

Tabulka 9: Aktivitní koeficienty lipogenních enzymů pacientů a kontrol ve frakci PL

Enzym	1	2	3	4	5	6	7	kontroly
Δ -9 desaturáza	0,88	0,63	0,76	0,94	0,72	0,74	0,53	0,65
elongáza*	3,95	3,97	4,08	3,85	4,62	4,88	4,39	6,22
Δ -5 desaturáza	2,84	3,90	4,95	3,15	2,97	3,21	4,45	2,17
Δ -6 desaturáza	10,62	8,39	7,05	10,35	27,19	19,72	4,61	29,23
de novo lipogeneze*	2,27	2,00	1,84	2,32	3,32	2,82	1,42	1,09

Tabulka 10: Aktivitní koeficienty lipogenních enzymů pacientů a kontrol ve frakci DG

Enzym	1	2	3	4	6	7	kontroly
Δ -9 desaturáza	7,71	4,81	4,78	6,17	5,10	2,18	2,26
elongáza*	27,43	33,28	35,26	23,82	27,38	51,15	66,60
Δ -5 desaturáza	1,79	3,18	3,61	2,89	4,74	1,78	2,04
Δ -6 desaturáza	2,99	2,03	2,83	1,88	2,34	2,87	19,58
de novo lipogeneze*	3,55	2,87	3,08	4,15	3,94	2,61	1,26

Tabulka 11: Aktivitní koeficienty lipogenních enzymů pacientů a kontrol ve frakci CE

Enzym	1	2	3	4	5	6	7	kontroly
Δ -9 desaturáza	3,75	14,80	20,08	13,62	18,08	24,98	14,67	13,11
elongáza*	39,11	6,92	7,23	9,08	7,26	6,36	7,60	13,25
Δ -5 desaturáza	6,93	9,17	13,03	8,05	8,27	9,47	12,62	6,33
Δ -6 desaturáza	0,85	0,58	0,73	0,72	1,95	1,87	0,41	2,74
de novo lipogeneze*	4,0	3,7	3,2	5,4	5,5	4,7	2,5	2,0

Tabulka 12: Průměrné hodnoty aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou v plazmě

Enzym	pacienti	kontroly	SD ($\mu\text{mol/l}$)
Δ -9 desaturáza	3,19	2,89	0,88
elongáza*	2,46	3,81	0,40
Δ -5 desaturáza	4,50	2,83	1,04
Δ -6 desaturáza	3,85	9,65	2,23
de novo lipogeneze*	1,94	0,74	0,86

Tabulka 13: Průměrné hodnoty aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci PL

Enzym	pacienti	kontroly	SD ($\mu\text{mol/l}$)
Δ -9 desaturáza	0,74	0,65	0,88
elongáza*	4,25	6,22	0,40
Δ -5 desaturáza	3,64	2,17	1,04
Δ -6 desaturáza	1,26	2,93	2,23
de novo lipogeneze*	2,28	1,09	0,86

Tabulka 14: Průměrné hodnoty aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci DG

Enzym	pacienti	kontroly	SD ($\mu\text{mol/l}$)
Δ -9 desaturáza	5,12	2,26	0,88
elongáza*	3,30	6,66	0,40
Δ -5 desaturáza	3,00	2,04	1,04
Δ -6 desaturáza	2,49	19,58	2,23
de novo lipogeneze*	3,37	1,26	0,86

Tabulka 14: Průměrné hodnoty aktivitních indexů enzymů Δ -desaturáz, elongáz a de novo lipogeneze pacientů s kontrolou ve frakci CE

Enzym	pacienti	kontroly	SD ($\mu\text{mol/l}$)
Δ -9 desaturáza	15,71	13,11	0,88
elongáza*	11,94	13,25	0,40
Δ -5 desaturáza	9,65	6,33	1,04
Δ -6 desaturáza	1,02	2,74	2,23
de novo lipogeneze*	4,10	2,00	0,86

Tabulka 15: Průměrné hodnoty koncentrací nasycených a ω-9 mononenasycených kyselin u pacientů a kontrol.

Mastná kyselina	Zkratka	Φ 1-4	Φ 5-7	kontrola	SD (μmol/l)
Myristová	C14:0	17,78	20,76	10,47	4,33
Palmitová	C16:0	1149,65	1911,54	556,42	554,65
Palmitoolejová - cis	9-C16:1-cis	28,90	71,54	15,19	23,99
Stearová	C18:0	455,08	897,35	346,21	238,33
Olejová	C18:1-N9	374,87	615,59	224,26	161,16
Nervonová*	C24:1-N9	489,03	888,73	615,60	166,80