

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Studium využití plazmatických lipoproteinů pro diagnostiku diabetu

Iva Vykydalová

Bakalářská práce

2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Iva Vykydalová**  
Osobní číslo: **C16215**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Studium využití plazmatických lipoproteinů pro diagnostiku diabetu**  
Zadávající 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 :

1. Seznamte se s literárními údaji o analýze a stanovení plazmatických proteinů a lipidových frakcí v plazmě pomocí chromatografických analytických postupů a specifikujte jejich účinnost a přesnost.
2. Prostudujte literární údaje o vzniku dyslipoproteinémie u diabetiků a analyzujte možné vlivy dyslipoproteinémie na kardiovaskulární a metabolické poruchy u diabetiků.
3. Diskutujte souvislosti koncentračních změn plazmatických lipoproteinů a lipidových frakcí se vznikem glykovaného hemoglobinu a rozvojem inzulinové rezistence u diabetiků.
4. Proveďte experimentální studii závislosti složení plazmatických lipidových frakcí na koncentraci glykovaného hemoglobinu u diabetiků a diskutujte její diagnostickou aplikaci.
5. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních a experimentálních údajů vyvoďte závěry o vlivu změn v koncentracích lipidových frakcí v plazmě na vznik a progresi diabetu.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Radim Janeček**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kaedár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

**Prohlašuji:**

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 nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 21. června 2019

Iva Vykydalová

Na tomto místě děkuji vedoucímu mé bakalářské práce panu prof. Ing. Alexanderovi Čeganovi, CSc. za přínosné připomínky a čas, který mi věnoval při korektuře této práce. Dále bych ráda poděkovala konzultantům Mgr. Radimu Janečkovi a Mgr. Rudolfu Kupčíkovi za ochotu a pomoc při zpracování experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji mé rodině za soustavnou podporu během celého studia.

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením a analýzou plazmatických lipoproteinů a lipidových frakcí. V teoretické části je věnována pozornost popisu chromatografických technik, které lze použít pro separaci lipoproteinů z lidské plazmy. Dále byly studovány příčiny vzniku dyslipoproteinémie a její vliv na kardiovaskulární a metabolické onemocnění u diabetiků typu 2. Experimentální část práce se věnuje alternativnímu způsobu zjištění hodnoty glykovaného hemoglobinu z lipidového profilu diabetiků. K dispozici bylo 20 vzorků plazmy od pacientů s diagnostikovaným diabetes mellitus 2. typu a 20 kontrolních vzorků plazmy zdravých dárců. Chromatografií na tenké vrstvě byly vzorky rozděleny na lipidové frakce fosfolipidů, cholesterolu, volných mastných kyselin, triacylglycerolů, esterů cholesterolu a porovnány. Cílem práce bylo zjištění významných rozdílů v lipidovém profilu zdravých a nemocných osob.

Po vyhodnocení naměřených dat byla zjištěna statistická významnost pouze u frakce cholesterolu, která se u diabetiků zvyšuje s rostoucím glykovaným hemoglobinem. Glykovaný hemoglobin proto není ideálním markerem pro posouzení změn v lipidovém metabolismu diabetiků 2. typu, protože charakterizuje především dlouhodobou míru kompenzace diabetu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

plazmatické lipoproteiny, dyslipoproteinémie, glykovaný hemoglobin, diabetes mellitus, tenkovrstvá chromatografie

## **ABSTRACT**

This thesis deals with isolation and analysis of plasma lipoproteins and lipid fractions. The theoretical part is devoted to description of chromatographic techniques that can be used for human plasma separation. Further, cause of origin of dyslipoproteinemia and also its effect on cardiovascular and metabolic disturbances in diabetic type 2 patients have been studied. The practical part is dedicated to an alternative way of glycosylated hemoglobin detection from lipid profile in diabetic patients. 20 samples of diabetic plasma and 20 samples from control samples from healthy donors were available. These samples were split into fraction of phospholipids, cholesterol, free fatty acids, triacylglycerols and cholesterol esters by thin layer chromatography. The aim of the work was to find significant differences in lipid spectrum between the healthy and diabetic population.

After data evaluation, the statistical significance was found only in cholesterol fraction. The level of cholesterol grows with the higher level of glycosylated hemoglobin. Glycosylated hemoglobin isn't an ideal marker for lipid metabolism changes evaluation in diabetes type 2 patients because it mainly characterizes a long-term degree of diabetic compensation.

## **KEYWORDS**

plasma lipoproteins, dyslipoproteinemia, glycosylated hemoglobin, diabetes mellitus, thin layer chromatography

# OBSAH

OBSAH .....	8
SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	10
SEZNAM ZKRATEK .....	11
0 ÚVOD .....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1.1 Lipoproteiny .....	14
1.1.1 Charakteristika .....	14
1.1.2 Klasifikace.....	14
1.1.3 Apolipoproteiny .....	15
1.2 Analýza a stanovení plazmatických proteinů a lipidových frakcí.....	17
1.2.1 Chromatografické metody.....	17
1.2.2 Stanovení a analýza molekulárních druhů lipoproteinových tříd.....	17
1.2.3 Kapalinová chromatografie .....	18
1.2.4 Plynová chromatografie .....	19
1.2.5 Gelová chromatografie.....	19
1.3 Diabetes mellitus 2. typu .....	20
1.3.1 Charakteristika a etiopatogeneze.....	20
1.3.2 Glykovaný hemoglobin .....	22
1.3.3 Terapie DM 2 .....	22
1.4 Metabolický syndrom .....	24
1.5 Inzulinová rezistence .....	24
1.6 Ateroskleróza.....	25
1.6.1 Mechanismus vzniku aterosklerózy u diabetiků .....	26
1.7 Diabetická dyslipoproteinémie .....	26
1.7.1 Terapie dyslipoproteinémie.....	27
1.7.2 Obezita a dyslipidémie .....	28



1.8	Adipokiny .....	29
1.8.1	Prozánětlivé adipokiny .....	30
1.8.2	Protizánětlivé adipokiny .....	31
1.8.3	Nové adipokiny .....	31
1.9	Kardiovaskulární komplikace diabetu 2. typu .....	32
1.9.1	Molekulární mechanismy srdečních patologií u diabetiků .....	33
1.9.2	Stručný přehled kardiovaskulárních komplikací u diabetiků .....	33
1.9.3	Prevence KVO u diabetiků 2. typu .....	34
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	35
2.1	Tenkvrstvá chromatografie .....	35
2.2	Cíl práce a předpoklad .....	36
2.3	Preanalytická fáze .....	37
2.4	Seznam použitých chemikálií .....	38
2.5	Přístrojové vybavení .....	39
2.6	Postup práce .....	40
2.7	Výsledky a vyhodnocení .....	41
2.8	Závěr .....	46
3	DISKUZE .....	47
4	LITERATURA .....	49

# SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

## OBRÁZKY

<b>Obrázek 1</b> Princip gelové chromatografie (Size Exclusion Chromatography, 2011) .....	20
<b>Obrázek 2</b> Mechanismus vzniku diabetes mellitus 2. typu; bludný kruh zhoršující sekreci a účinek inzulínu (podle V. Bartoše) (Rybka, 2007) .....	21
<b>Obrázek 3</b> Patogeneze aterosklerózy u diabetu (Reusch, 2011).....	25
<b>Obrázek 4</b> Předpokládané změny v lipidovém spektru .....	36
<b>Obrázek 5</b> Zobrazení kalibrační závislosti frakce fosfolipidů při aplikaci ve formě teček.....	37
<b>Obrázek 6</b> Zobrazení kalibrační závislosti frakce fosfolipidů při aplikaci ve formě proužků	38
<b>Obrázek 7</b> Kalibrační deska; nanášení vzorku ve formě proužků .....	40
<b>Obrázek 8</b> Ilustrativní vyhodnocení 7. desky v programu ImageLab .....	43
<b>Obrázek 9</b> Porovnání intenzit skvrn vzorků vztažených na intenzitu standardu mezi diabetiky a kontrolní skupinou v jednotlivých frakcích .....	43
<b>Obrázek 10</b> Statistická významnost jednotlivých lipidových frakcí .....	44
<b>Obrázek 11</b> 7.deska (vzorky pacientů s DM2) v 3D zobrazení.....	45
<b>Obrázek 12</b> Chromatografické zobrazení jedné linie (jeden pacient) na 7.desce se vzorky diabetiků.....	46

## TABULKY

<b>Tabulka 1</b> Použité chemikálie .....	38
<b>Tabulka 2</b> Parametry použitých chemikálií .....	39
<b>Tabulka 3</b> Rozmístění jednotlivých vzorků na chromatografické desky .....	41
<b>Tabulka 4</b> Souhrnná výsledková tabulka diabetiků.....	42
<b>Tabulka 5</b> Výsledková tabulka t-testu .....	45

## SEZNAM ZKRATEK

Apo	apolipoprotein
ASS	akutní srdeční selhání
BMI	body mass index (index tělesné hmotnosti)
CE	estriřikovaný cholesterol
CM	chylomikrony
CMP	cévní mozková příhoda
DM 2	diabetes mellitus 2. typu
GC	gas chromatography (plynová chromatografie)
GPC	gas permeation chromatography (gelová chromatografie)
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HDL	high density lipoproteins (lipoproteiny s vysokou hustotou)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HSL	hormon senzitivní lipáza
CHOL	cholesterol
IDL	intermediate density lipoproteins (lipoproteiny o střední hustotě)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
IR	inzulinová rezistence
KMP	kardiomyopatie
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LCD	low carbohydrate diet (nízkosacharidová dieta)
LDL	low density lipoproteins (lipoproteiny s nízkou hustotou)
MF	mobilní (pohyblivá) fáze
MHO	metabolic healthy obesity (metabolicky zdravá obezita)
MS	metabolický syndrom

MUO	metabolic unhealthy obesity (metabolicky nezdravá obezita)
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny
PL	fosfolipidy
TAG	triacylglyceroly
TLC	thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
VLDL	very low density lipoproteins (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou)
VMK	volné mastné kyseliny
WHO	World health organization (Světová zdravotnická organizace)

## 0 ÚVOD

Diabetes mellitus je metabolické onemocnění, u kterého se rozlišuje několik typů. Jedná se o diabetes 1. a 2. typu, gestační diabetes a další specifické druhy, které se mohou vyskytnout v důsledku endokrinních onemocnění, genetických mutací nebo např. užíváním některých léků. Většina nemocných trpí diabetem 2. typu, který významně souvisí s životním stylem jedince, a je mu proto také věnována velká pozornost. Rizikové faktory ovlivňující vznik diabetu 2. typu jsou hlavně exogenního charakteru, to znamená, že je lze ovlivnit, a tím pádem předejít samotné manifestaci.

Základním klinickým projevem této nemoci je hyperglykémie, avšak už několik let před diagnostikou je možné zachytit jisté změny, které naznačují pravděpodobný budoucí rozvoj diabetu. Mezi tyto změny se řadí i modifikace v lipidovém metabolismu, na které má vliv mimo jiné přítomnost metabolického syndromu, obezity či inzulinové rezistence.

Prevalence diabetu 2. typu se v populaci rok od roku zvyšuje, proto je třeba se kromě edukativních preventivních opatření zabývat studiem časných markerů diabetu, díky kterým by bylo možné odhalit nastupující diabetes a zabránit jeho plné manifestaci a následnému rozvoji typických diabetických komplikací, což jsou především kardiovaskulární a metabolické potíže. Vzhledem k již prokázané úzké souvislosti mezi diabetem a KVO se v posledních letech lze v literatuře setkat s termínem kardiabetes, který umocňuje důležitost komplexního řešení zdravotního stavu pacienta, jak z hlediska kardiologie tak i diabetologie.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Lipoproteiny

### 1.1.1 Charakteristika

Lipoproteiny jsou nekovalentní komplexy proteinů (apolipoproteinů) a lipidů, které se seskupují do specifických kulovitých částic. Vyskytují se hlavně v krevní plazmě a v cytoplazmě. Jednotlivé třídy lipoproteinů se odlišují na základě jejich složení, hustoty a velikosti, což jsou vlastnosti, které mají vliv na jejich schopnost ukládat se do stěn cév.

Samotná struktura lipoproteinu souvisí s mírou rozpustnosti ve vodě. V jádře lipoproteinu jsou nepolární triacylglyceroly (TAG) a esterifikovaný cholesterol (CE). Obal lipoproteinové částice je složen z amfipatických fosfolipidů (PL), cholesterolu (CHOL), mezi něž jsou vnořeny bílkovinné částice – apoproteiny. Hlavní funkcí lipoproteinů je transport a distribuce lipidů krví. Lipidy jsou hydrofobního charakteru, a proto musí být hydrofilním prostředím krve dopravovány ve formě lipoproteinových částic, případně skrz specifický nosič (takto jsou přenášeny pouze mastné kyseliny ve vazbě na albumin).

### 1.1.2 Klasifikace

Je rozlišováno pět tříd lipoproteinů. Hlavním kritériem pro jejich klasifikaci je hustota, přičemž platí, že s rostoucím obsahem proteinů se hustota lipoproteinových částic zvyšuje.

#### **Chylomikrony**

Největší lipoproteinové partikule jsou chylomikrony. Jsou až z 90 % tvořeny TAG, což způsobuje jejich nízkou hustotu. Na povrchu molekuly jsou bílkovinné částice apolipoproteiny typu ApoB-48, nezbytné pro vlastní syntézu chylomikronů. Tvorba probíhá v buňkách tenkého střeva při vstřebávání tuků ze stravy. Největší koncentrace chylomikronů je cca 3 hodiny po jídle, po lačnění by se v krvi neměly vyskytovat. Chylomikrony se dostávají exocytózou do lymfatické soustavy, kde dojde k navázání apolipoproteinu. Takto jsou chylomikrony stabilizovány, aby nedocházelo k přilnutí ke stěnám cév. Dále se lymfou dostávají přes hrudní mízovod do krve a roznáší převážně TAG ke tkáním.

#### **VLDL (very low density lipoproteins)**

VLDL jsou lipoproteiny o velmi nízké hustotě. Jsou produkovány játry. Hlavní složkou jsou triacylglyceroly, významný podíl tvoří ale i fosfolipidy a cholesterol. Jejich hlavní funkcí je transport TAG k extrahepatálním tkáním. Tato třída lipoproteinů má velmi krátký

biologický poločas a to přibližně 30 minut. Uvolněné VLDL partikule se postupně zbavují TAG, což je umožněno lipoproteinovou lipázou. Procentuální zastoupení cholesterolu a jeho esterů stoupne, dojde ke zvýšení hustoty a částice se zmenší. Konečným produktem tohoto procesu je LDL vzniklý přes meziformu IDL (lipoprotein o střední hustotě). Koncentrace VLDL se během dne různí v závislosti na příjmu a složení potravy.

### **LDL (low density lipoproteins)**

Snížením obsahu triacylglycerolů ve VLDL vznikají lipoproteinové částice o nízké hustotě. Hlavní komponentou je esterifikovaný cholesterol. Jejich funkce spočívá v přenosu cholesterolu a esterů cholesterolu do buněk. LDL a IDL jsou převzaty periferními tkáňovými buňkami přes receptory zprostředkovanou endocytózu, a tak zbývající TAG a cholesterol mohou být dopraveny do extrahepatálních tkání. Zvýšení hladiny LDL cholesterolu je rizikové pro rozvoj aterosklerózy.

### **HDL (high density lipoproteins)**

Lipoproteiny s vysokou hustotou jsou nejmenší lipoproteinové částice. Celkový obsah lipidů se pohybuje okolo 50 %. HDL se vyskytují v několika podtypech lišící se zastoupením jednotlivých lipidů. HDL jsou produkovány hepatocyty v nezralé formě podoby disku označované jako nascentní HDL. V této podobě obsahují fosfolipidy a apoproteiny. Zralé HDL partikule obsahují navíc cholesterol. Tato třída lipoproteinů je jako jediná schopna reverzního transportu cholesterolu, tedy dopravy přebytečného volného cholesterolu z extrahepatálních tkání zpět do jater a také výměna CE a TAG s VLDL partikulemi. Jejich koncentrace je v průběhu dne poměrně konstantní, stejně tak je tomu i u výše zmíněných LDL partikulí. HDL částice mají prospěšné protizánětlivé, antioxidační a antitrombotické vlastnosti, tudíž zvýšená hladina HDL cholesterolu je velmi přínosná pro snížení rizika vzniku aterosklerózy.

(Kodíček, 2004), (Holčapek, 2015), (Elliott, 2009)

### **1.1.3 Apolipoproteiny**

Apolipoproteiny (Apo) jsou bílkovinné složky lipoproteinových částic. Každá třída lipoproteinu je charakteristická svým souborem apolipoproteinů. Hlavní skupiny apolipoproteinů jsou ApoA, ApoB, ApoC a ApoE. Společně s fosfolipidy a cholesterolem utváří hydrofilní obal lipoproteinů a umožňují tak jejich rozpustnost a stabilitu. Jednotlivé druhy mají různé funkce, kterými mohou ovlivňovat osud lipoproteinových částic a tím zasahovat do lipidového metabolismu a procesu aterogeneze.

Mezi tyto funkce se řadí:

- Transport a distribuce lipidových frakcí mezi tkáněmi
- Účast při syntéze některých lipoproteinových tříd
- Kofaktory enzymů v lipidovém metabolismu
- Vazba na lipoproteinové receptory (ligandy)

Pro klinickou praxi je významné stanovení ApoB i ApoA-I, respektive jejich poměr. Všechny třídy lipoproteinů, které obsahují ApoB jsou potenciálně aterogenní. Záleží na jejich velikosti, větší částice – chylomikrony a VLDL jsou méně aterogenní v porovnání s LDL, jelikož obtížně pronikají do subendotelového prostoru. Je pravděpodobné, že nerovnováha mezi apolipoproteiny na jednotlivých lipoproteinových částicích souvisí s budoucím rozvojem patologických stavů, a to zejména KVO a diabetes mellitus (Von Zychlinski, 2014).

#### **Apolipoprotein AI (ApoA-I)**

Apolipoprotein A-I je hlavní proteinová komponenta lipoproteinů s vysokou denzitou (HDL), jehož syntéza probíhá ve střevě a v játrech. Účastní se reverzního transportu cholesterolu a má tedy protiatерogenní účinky.

#### **Apolipoprotein B (ApoB)**

Apolipoprotein B je hlavní proteinová komponenta lipoproteinů s nízkou denzitou (VLDL, LDL). Vyskytuje se ve dvou formách jako ApoB-100 a ApoB-48. Jedná se o nejpřesnější apolipoproteinový marker rizika vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Udává počet aterogenních částic, neboť všechny hlavní aterogenní částice obsahují jednu molekulu ApoB-100 při různém množství cholesterolu (Kvapil, 2013), (Vaverková, 2012).

Bylo prokázáno rostoucí riziko vzniku DM 2 při zvýšené hladině ApoB a poměru ApoB/ApoA-I. Naopak obrácená tendence byla nalezena u hladiny ApoA-I. Měření koncentrace apolipoproteinů poskytuje doplňující informace při predikci rozvoje DM 2 (Chou, 2019).



## **1.2 Analýza a stanovení plazmatických proteinů a lipidových frakcí**

### **1.2.1 Chromatografické metody**

Chromatografie patří mezi základní analytickou separační metodu. Separační techniky jsou typické vysokou selektivitou a jsou vhodné především pro komplexní vzorky. Celý analytický proces je možné rozdělit do dvou kroků – kroku separačního, během nějž dojde k fyzické separaci analyzovaného vzorku a následně druhý krok – detekce čistých složek vzorku. Chromatografické techniky jsou dle charakteru separačního děje založeny na rozdělování látek mezi dvě fáze. Dílčí složky vzorku se dělí na základě ustavování sorpčních, rozpouštěcích, případně iontově výměnných rovnováh mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Principem separačního procesu složek vzorku při chromatografii je opakované ustanovování rovnováh vzorku mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (zakotvenou) fází (Opekar, 2010).

Chromatografické metody lze rozdělit do několika skupin. Vzhledem k jejich rozmanitosti se dělí dle několika aspektů.

#### **Dle skupenství mobilní fáze**

- Kapalinová
- plynová

#### **Dle uspořádání stacionární fáze**

- Kolonová – stacionární fáze je v trubici
- Plošná – papírová, tenkovrstvá

#### **Dle povahy převládajícího separačního děje**

- Rozdělovací – dělení na základě různé rozpustnosti složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi
  - Adsorpční – dělení na základě různé schopnosti vázat se na povrch SF
  - Iontově-výměnná – pro separaci je rozhodující velikost elektrostatických přitažlivých sil mezi funkčními skupinami SF a ionty analyzovaného vzorku
  - Gelová – složky vzorku jsou separovány dle velikosti na SF s póry
  - Afinitní – SF váže ty složky vzorku, ke kterým je selektivní
- (Klouda, 2003)

### 1.2.2 Stanovení a analýza molekulárních druhů lipoproteinových tříd

Jednotlivé lipoproteinové třídy obsahují profil molekul odlišující se zastoupením mastných kyselin a alkoholických složek. Nejsložitější z nich jsou triacylglyceroly (jedna molekula glycerolu je esterifikována se třemi různými mastnými kyselinami). Určení molekulárních druhů v intaktní formě vyžaduje všechny kombinace složek dle délky a větvení řetězce i počet dvojných vazeb. Toto stanovení probíhá většinou po předchozí separaci tenkovrstvou chromatografií lipidové třídy jako celku. Ke stanovení molekulárních druhů lze použít RP-HPLC a GLC.

### 1.2.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejpoužívanějších separačních metod. Dělení probíhá na základě odlišné distribuce mezi mobilní kapalnou fází a stacionární tuhou fází, což je způsobeno různou afinitou analytů vůči oběma fázím. Samotné dělení probíhá v separační koloně. V HPLC se uplatňuje několik separačních mechanismů, nejčastěji adsorpce, iontová výměna a afinitní interakce. Množství dávkovaného vzorku je v řádech  $\mu\text{l}$  a do mobilní kapalnou fázi se aplikuje pod tlakem, který je zpravidla v rozmezí 30 až 60 MPa.

HPLC je univerzální z hlediska možnosti použití pro široké spektrum vzorků. Vzhledem k tomu, že se pracuje při laboratorní teplotě a vzorek není třeba převádět do plynného skupenství, lze tuto techniku využít i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých vzorků.

Detektory umožňují kvantitativní analýzu, kdy odezva detektoru (plocha a výška píku) je přímo úměrná koncentraci stanovovaných látek. Citlivost měření je podmíněna typem detektoru.

Nejběžněji používané detektory v HPLC jsou spektrofotometrický UV-vis, hmotnostní, fluorimetrický a refraktometrický. Detektory by měly splňovat několik podmínek, především být selektivní pro analyty a zároveň co nejméně citlivé na mobilní fázi (Klouda, 2003).

Co se týče konkrétního využití HPLC pro kvantifikaci a kvalifikaci lipidových frakcí, lipoproteiny jsou separovány podle jejich velikosti a jednotlivé složky (hlavně TAG a CHOL) detekovány enzymaticky. Pro separaci hlavních tříd lipoproteinů v plazmě a séru jsou používány různé kolony obsahující neporézní gely na bázi polymerů.

Velmi používaným způsobem separace je HPLC s iontově výměnnou kolonou. HPLC s iontově výměnnou kolonou eluuje lipoproteiny na základě iontové síly na povrchu lipoproteinových partikulí a jejich hydrofobních vlastností a určuje hladinu cholesterolu separovaných lipoproteinů bez překrývání lipidových frakcí. Tato metoda poskytuje separaci

lipoproteinů a lipoproteiny větší velikosti jsou eluovány nejdříve (respektive v pořadí: chylomikrony, VLDL, IDL, LDL a HDL). HPLC může být kontaminována plazmatickými proteiny, které jsou eluovány souběžně s HDL, především albumin. Iontově výměnná HPLC je používána k popisu různých typů dyslipidemií (Hafiane, 2015).

#### **1.2.4 Plynová chromatografie**

Separční technika plynové chromatografie je založena na dělení složek vzorku, který lze převést do plynné fáze, aniž by došlo k destrukci složek. Podmínkou převedení analytů v plyny je tepelná stálost, dostačující tlak syté páry a molekulová hmotnost nepřesahující 1000 kg/mol. Mobilní fází je tzv. nosný plyn, což je zpravidla dusík, helium, vodík nebo argon. Kolony mohou být plněné tuhou stacionární fází (GSC – gas-solid chromatography), případně pevným inertním nosičem, na kterém je vrstva kapalné stacionární fáze (GLC – gas-liquid chromatography).

Opakující se analytický cyklus začíná aplikací vzorku stříkačkou do nástřikové komory – injektoru, kde dojde ke zplynění roztoku analyzovaného vzorku a je unášen ve formě par nosným plynem směrem ke koloně. Těkavější vzorky se kolonou pohybují rychleji než méně těkavé vzorky, současně analyzované vzorky, které interagují se SF procházejí kolonou pomaleji. V koloně jsou analyzované složky separovány na základě různé schopnosti vázat se se SF. Na konec stacionární fáze se nejprve dostávají ty složky vzorku, které byly méně zadržované.

Nejpoužívanějším detektorem v GC je plamenově ionizační detektor (FID), fotoionizační detektor (PID), hmotnostní detektor (MSD), termovodivostní detektor (TCD).

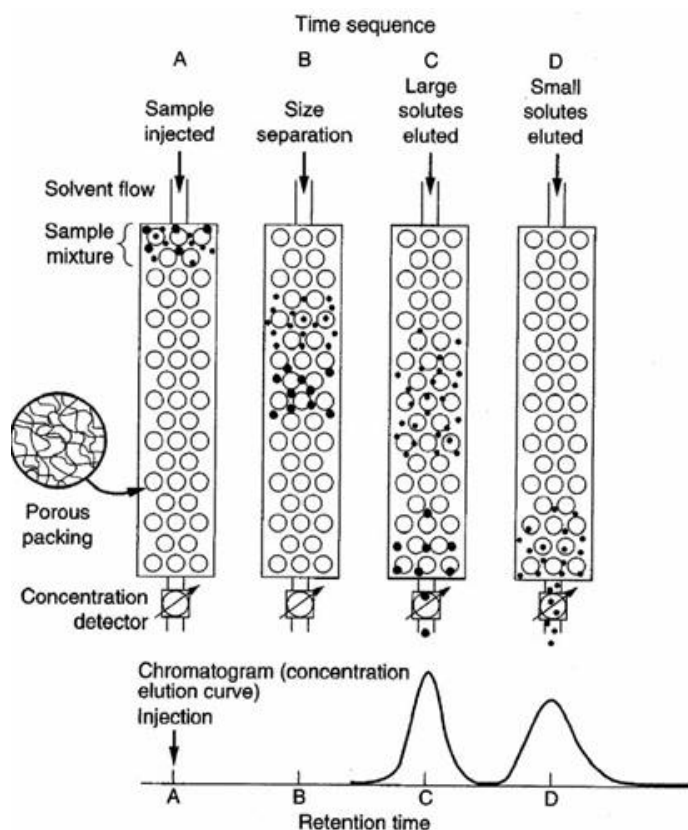
#### **Plynová rozdělovací chromatografie**

Detekční systémy GLC poskytují vysokou citlivost často v koncentracích o řádech nanogramů až pikogramů. Většina molekul je nedostatečně těkavá, a není proto umožněno přímé GLC metody. Je vyžadována deprivatizace proto, aby vzorky byly více těkavé. GLC také často vyžaduje složitější přípravu vzorku. Proto rapidně roste použití vysoce citlivé HPLC-MS (Wilson, 2003).

#### **1.2.5 Gelová chromatografie**

Gelová chromatografie (GPC, v angličtině také pod názvem size-exclusion chromatography – SEC) není chromatografickou technikou v pravém slova smyslu, jelikož nedochází k ustavování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází, ale partikule se dělí na základě velikosti a tvaru. To je v klinické praxi důležité pro stanovení jednotlivých

lipoproteinových částic, jejichž rozměry souvisí s mírou aterogeneze. Stacionární fází jsou kulovité částice gelového charakteru, které mají póry s definovanými rozměry. Molekuly analyzovaného vzorku s průměrem menším než mají póry, proniknou difuzí do vnitřních částí gelové částice a tím jsou na koloně zadrženy. Větší molekuly, které neprojdou dovnitř pórů jsou unášeny proudem mobilní fáze a vytékají z kolony jako první. Jako stacionární fáze slouží silikagel nebo methakrylátové pryskyřice, mobilní fází je většinou fosfátový pufr. Princip techniky je zobrazen na Obr. 1.



**Obrázek 1** Princip gelové chromatografie (*Size Exclusion Chromatography, 2011*)

## 1.3 Diabetes mellitus 2. typu

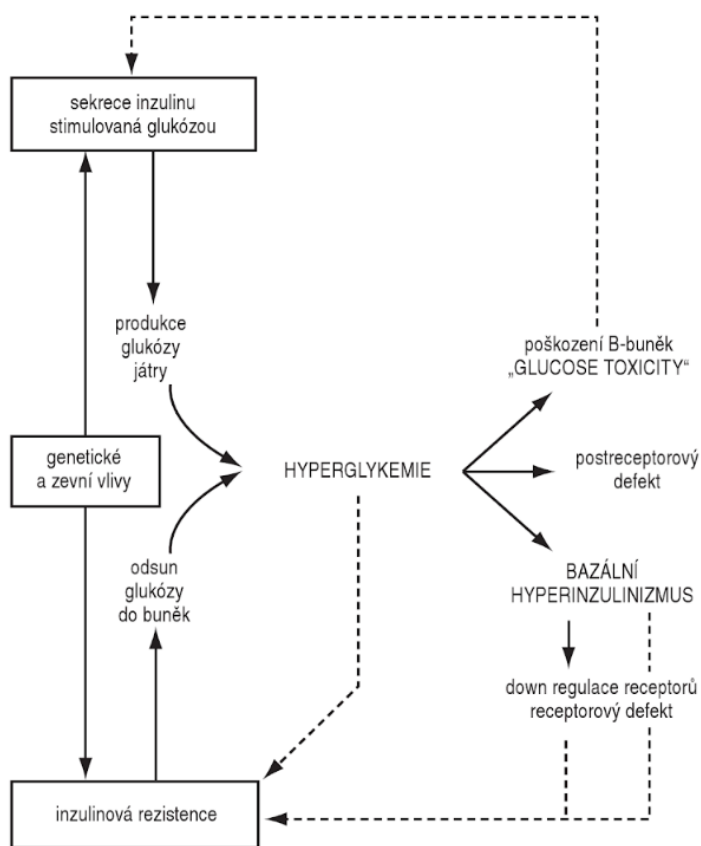
### 1.3.1 Charakteristika a etiopatogeneze

Diabetes mellitus 2. typu (DM 2) je metabolické progresivní onemocnění postihující v různé míře všechny rasy a národy. Nemocní s DM 2 tvoří zhruba 85 až 90 % všech diabetiků. Onemocnění se vyznačuje relativním nedostatkem inzulínu, což v organismu vede k porušení glukózové homeostázy. Na rozdíl od diabetu 1. typu nejde o neschopnost  $\beta$ -buněk pankreatu produkovat inzulín. Pacienti s DM 2 nejsou zpravidla doživotně závislí na exogenním podávání inzulínu. Základní poruchou je nerovnováha mezi sekrecí a účinkem inzulínu v glukózovém metabolismu. Funkce pankreatických  $\beta$ -buněk může být negativně

ovlivněna hyperglykemií, chronicky zvýšenou koncentrací volných mastných kyselin, případně ukládáním tuku do slinivky břišní.

Na vznik diabetu 2. typu má vliv řada zejména exogenních faktorů souvisejících se životním stylem. Především se jedná o nadměrný příjem vysokokalorické a průmyslově zpracované potravy, s tím související obezita (nebezpečná je hlavně obezita abdominálního typu). Nepříznivý vliv má také nedostatečná fyzická aktivita, kouření cigaret a psychický stres. Mechanismus vzniku DM 2 je znázorněn na Obr. 2.

K manifestaci dochází obvykle kolem 40. roku věku, ale není výjimkou diagnostika DM 2 již o mnoho let dříve. Onemocnění bývá zpočátku bez typických příznaků, proto je záchyt často náhodný. DM 2 probíhá zpočátku latentně, již dlouhou dobu před klinickou manifestací. Diabetes je mnohdy diagnostikován až při objevení chronických komplikací či příznaků metabolického syndromu. V době záchytu jsou již často pozorovány specifické angiopatické komplikace, nefropatie nebo příznaky makrovaskulárního postižení. Diabetes mellitus bývá zpravidla diagnostikován při opakovaném naměření glykémie, tedy zvýšené hladině glukózy v krvi. Klinické příznaky diabetu zahrnují časté a nadměrné močení, zvýšený pocit žízně. Dále se může objevit hubnutí, i navzdory zvýšené chuti k jídlu, případně chronická únava.



**Obrázek 2** Mechanismus vzniku diabetes mellitus 2. typu; bludný kruh zhoršující sekreci a účinek inzulínu (podle V. Bartoše) (Rybka, 2007)

### 1.3.2 Glykovaný hemoglobin

Glykovaný hemoglobin je považován za poměrně přesný marker kompenzace diabetu a jeho stanovení již dnes patří mezi rutinní vyšetření. Glykací hemoglobinu rozumíme neenzymatickou reakci glukózy a  $\text{NH}_2$  skupiny proteinů za vzniku nestabilního aldiminu, který se přesmykem stabilizuje na ketoamin. Celkový glykovaný hemoglobin je směsí tří frakcí HbA1a, HbA1b, HbA1c. Nejvíce zastoupena je frakce HbA1c specifická pouze pro glukózu. Význam glykovaného hemoglobinu spočívá v možnosti zhodnotit průběh diabetu v dlouhodobém hledisku. Hodnota HbA1c odráží průměrnou hodnotu glykémie v období cca čtyř až šesti týdnů před stanovením, což je spjato s dobou přežití erytrocytu. Referenční metodou pro stanovení HbA1c je HPLC/MS a jako jednotky jsou používány mmol/mol celkového hemoglobinu. Referenční hodnota pro zdravé dospělé je do 39 mmol/mol.

Stanovení koncentrace glykovaného hemoglobinu se dnes již provádí přímo v ordinaci ošetřujícího lékaře. K tomu se využívá plně automatizovaný analyzátor, přičemž stačí pacientovi odebrat jen malou kapku kapilární krve. Vyšetření pomocí takových přístrojů poskytuje spolehlivé a okamžité výsledky bez nutnosti transportu vzorku do biochemické laboratoře (Pelikánová, 2011), (Perušičová, 2015).

### 1.3.3 Terapie DM 2

Léčba diabetes mellitus 2. typu má komplexní charakter. Hlavním cílem léčby je zlepšení kompenzace onemocnění, zabránění kolísání glykémie, dosažení fyziologického složení lipidového spektra, normalizace tělesné hmotnosti a hodnot krevního tlaku.

V první řadě je namístě edukace pacienta a striktní úprava životosprávy. Pro diabetiky s  $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$  je nutná redukce tělesné hmotnosti. V tomto případě je třeba zredukovat denní příjem energie a zařadit do každodenního režimu pravidelný pohyb.

#### Nízkosacharidová dieta (LCD)

Klíčový vliv na řízení DM 2 má strava. WHO uznává, že neexistuje jedna konkrétní dieta, kterou by bylo vhodné doporučit pro jednotnou terapii diabetu. Dietní pokyny většiny diabetologů i odborných publikací se ale obvykle shodují na doporučeném denním příjmu 45 – 65 % energie ze sacharidů (což je až 250 g sacharidů/den), 20 – 35 % z tuků a 15 – 20 % energie mají tvořit bílkoviny. Tento tradiční vysokosacharidový, zároveň nízkoproteinový a nízkotukový stravovací model začal být v minulých letech zpochybňován. Objevují se studie, které se zabývají otázkou nízkosacharidového stravování a jeho účinků na kompenzaci diabetu. Bylo prokázáno přímé ovlivnění postprandiálních hladin glukózy a inzulinu

a současně dochází u pacientů na LCD k rychlému poklesu tělesné hmotnosti. Principem tohoto stravování je restrikce příjmu sacharidů na cca 100 g/den (některé prameny doporučují ještě razantnější omezení).

Nízkosacharidová dieta je v současnosti velmi kontroverzní téma, jelikož prozatím neexistuje dostatek vědeckých důkazů, které by potvrdily dlouhodobý kladný vliv na kompenzaci diabetu. Dalším problémem je neochota pacientů dodržovat poměrně striktní stravovací návyky, a tak z důvodu vlastního komfortu mnohdy volí farmakoterapeutickou léčbu bez větších zásahů do jídelníčku (Sainsbury, 2018), (Meng, 2017).

## **Farmakoterapie DM 2**

Doporučení pro farmakologickou léčbu diabetu zahrnují monoterapii a/nebo kombinační léčbu dostupnými preparáty tak, aby byla dosažena nebo udržena hladina glykémie co nejbližší fyziologickému rozmezí, a to bez zvýšeného rizika vzniku hypoglykémie. Tyto léky mohou přímo nebo nepřímo ovlivňovat lipidový profil pacienta.

V současnosti je škála dostupných antidiabetik velmi rozmanitá a algoritmus užívání a jejich případná kombinace je individuálně řešena s každým pacientem. Charakteristika různých druhů antidiabetik je nad rámec této práce, přesto za zmínku stojí thiazolidindiony, inkretinová terapie, gliptiny, což je velmi stručný výčet v současnosti často ordinovaných léků pro diabetiky. Běžně se kombinuje antidiabetikum s inzulinem. Níže je popsán lék první volby metformin a inzulin.

### **Metformin**

Lékem první volby s antihyperglykemickým efektem je metformin. Nasazuje se zpravidla bezprostředně po záchytu diabetu současně s režimovými opatřeními a celkovou edukací pacienta. Metformin stimuluje glykolýzu, má jasný inhibiční efekt na glukoneogenezi a stejně tak i na produkci glukózy játry. Užívání vede k snížení TAG, celkového cholesterolu a LDL cholesterolu, zároveň dochází k mírnému vzestupu hladin HDL cholesterolu. Ve většině případů je pacienty dobře tolerován.

### **Inzulin**

Mnoho pacientů s DM 2 je často léčeno inzulinem již v raném stádiu nemoci, nehledě na to, že je dostupných mnoho jiných antidiabetik, u kterých nehrozí tak velké riziko hypoglykémie oproti inzulinu. S rostoucí dobou trvání diabetu a postupnou zhoršující se funkcí  $\beta$ -buněk pankreatu, většina pacientů později potřebuje inzulin k efektivní léčbě hyperglykémie. Přímé účinky inzulinu na lipidový profil zahrnují snížení TAG, objevující se

převážně až u výraznějšího zlepšení glykémie. Dále je u pacientů pozorováno zvýšení HDL cholesterolu, zatímco LDL cholesterol není ovlivněn (Rosenblit, 2016).

## 1.4 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom (MS) je soubor faktorů, které představují riziko pro rozvoj vzniku diabetes mellitus 2. typu nebo kardiovaskulárního onemocnění. Pro svůj význam je středem pozornosti řady medicínských oborů, nejen diabetologie, ale především preventivní kardiologie, endokrinologie, obezitologie, aj. (Rybka, 2007).

Diagnostika metabolického syndromu je dána přítomností alespoň tří z následujících pěti symptomů:

- Abdominální obezita – obvod pasu (muži: > 95 cm, ženy: > 80 cm)
- Zvýšená hladina triacylglycerolů ( $\geq 1,7$  mmol/l)
- Snížená hladina HDL-cholesterolu (muži: < 1,0 mmol/l, ženy: < 1,3 mmol/l)
- Glykémie nalačno ( $\geq 5,6$  mmol/l, v žilní plazmě)
- Hypertenze ( $\geq 130/85$  torr)

## 1.5 Inzulinová rezistence

Inzulinovou rezistencí (IR) rozumíme poruchu účinku inzulinu v cílové tkáni, v užším slova smyslu se jedná o defekt účinku inzulinu v metabolismu glukózy. Inzulinová rezistence je také definována jako snížené množství inzulinu v normálních inzulin-citlivých tkáních, jako jsou játra, svaly a tuková tkáň. Poškození vedoucí k IR může být lokalizováno na kterémkoli stupni dějů zajišťující fyziologický účinek inzulinu. Morfologickým podkladem je změna funkce a struktury receptoru pro inzulin, případně porucha v postreceptorových dějích. Dle etiopatogeneze je inzulinová rezistence rozdělována na primární (geneticky podmíněnou) a sekundární, která se normalizuje po odstranění příčiny vedoucí k jejímu rozvoji (Pelikánová, 2011).

Inzulinová rezistence je faktor, který významně přispívá k brzkému rozvoji a progresi DM 2. Hlavní rysy inzulinové rezistence jsou snížená syntéza glykogenu, zvýšené vychytávání glukózy v kosterní svalovině, defekty v syntéze glykogenu a zvýšená míra glukoneogeneze v játrech. Nejvýznamnější tkáni z hlediska působení inzulinu je kosterní sval. Citlivost k inzulinu se zvyšuje s rostoucím relativním obsahem aktivní svalové hmoty a se snižujícím se obsahem tukové tkáně, především abdominálního typu. Okolnosti přispívající ke



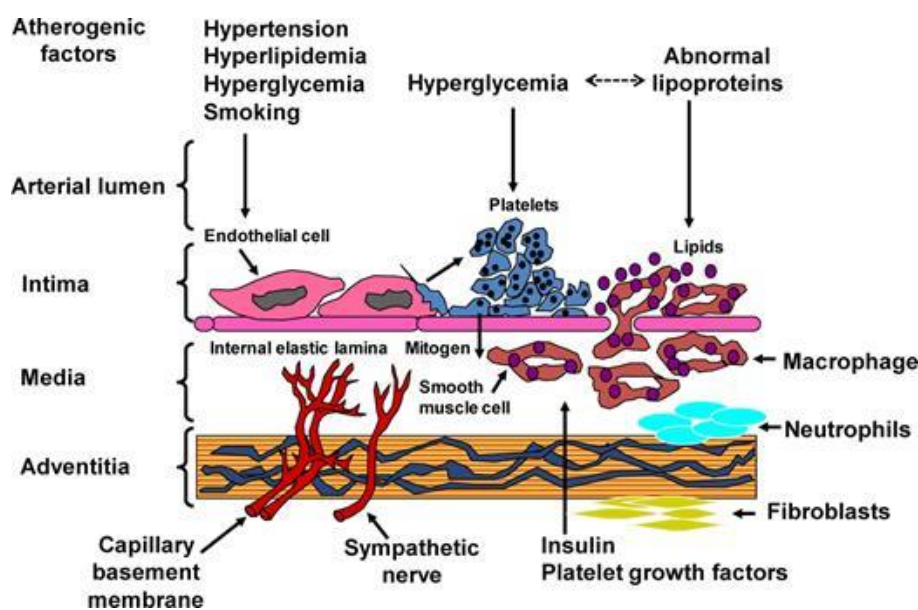
vzniku IR a její progresi jsou obezita, špatná kompenzace diabetu, psychický stres, kouření a nedostatek pohybu.

Inzulinová rezistence v tukové tkáni má také významný vliv na hyperglykémii, protože tuková tkáň je hlavní zásobní místo substrátů a energie, např. mastných kyselin a glycerolu. Proto zvýšená lipolýza může zvýšit jaterní glukoneogenezi. Navíc patologicky zvýšený přítok mastných kyselin do jater vyvolává zvýšení intracelulárních lipidů. Nahromadění lipidových metabolitů přispívá k lipidy vyvolané (jaterní) inzulinové rezistenci (Erion, 2016).

## 1.6 Ateroskleróza

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění cévní stěny způsobené ukládáním cholesterolu v intimě cév zásobujících srdeční sval a mozek. Problematika aterogeneze je v současnosti velmi diskutovaným tématem mnoha vědeckých týmů po celém světě, a proto může být k této tématice přistupováno z vícero odlišných pohledů.

Zvýšené koncentrace aterogenních lipidových partikulí nesoucích cholesterol krevním oběhem představují základní rizikový faktor pro vznik KVO. Tento fakt je ještě více umocněn u diabetických pacientů, kteří často trpí dyslipoproteinémií. Další rizikové faktory přispívající k progresi aterosklerózy jsou hyperglykémie, hypertenze, obezita a kouření cigaret. Riziko kardiovaskulárního onemocnění se zvyšuje s dobou trvání především špatně kompenzovaného DM 2. Schématické znázornění patogeneze aterosklerózy u diabetiků je patrné z Obr. 3.



Obrázek 3 Patogeneze aterosklerózy u diabetu (Reusch, 2011)

### **1.6.1 Mechanismus vzniku aterosklerózy u diabetiků**

Deficit inzulínu má za následek zvýšené uvolňování VLDL partikulí z jater. Dochází rovněž ke zvýšení přísunu mastných kyselin a k poklesu aktivity lipoproteinové lipázy, která má klíčovou funkci v metabolismu lipoproteinů s vysokým obsahem TAG. Snížení aktivity lipoproteinové lipázy způsobí poruchy v metabolismu VLDL, a to vede ke snížení množství HDL, které jsou produkovány během metabolismu VLDL. Dojde též ke vzrůstu plazmatických TAG. Triacylglycerolémie mění LDL částice na malé denzní LDL. Ty jsou snadno oxidovány a v takové podobě jsou přijmuty makrofágy. Takto se mění v pěnové buňky. Lipoproteinové remnanty představující zbytek degradovaných lipoproteinů s vysokým obsahem TAG – chylomikrony, VLDL, nezůstávají v krvi zdravých lidí, protože jsou ihned metabolizovány lipoproteinovou lipázou. Snížená aktivita lipoproteinové lipázy způsobuje zvýšení lipoproteinových remnant, které jsou následně převzaty makrofágy. Tak opět vznikají pěnové buňky.

V případě, kdy je v krvi vysoká hladina glukózy, LDL jsou glykosylovány a setrvávají dlouhou dobu v krvi, protože mají nízkou afinitu k LDL receptorům. Glykosylované LDL poté podléhají oxidaci a vznikají malé denzní LDL. Ty jsou přijmuty makrofágy, které je poté přemění na pěnové buňky (Takeda, 2010).

LDL umístěné v intimě jsou oxidací modifikovány. Takto pozměněné lipidy poté vyvolávají expresi adhezivních molekul, cytokinů, chemokinů a dalších mediátorů zánětu v makrofázích i v buňkách endotelu. Oxidaci podléhají nejen LDL, ale také VLDL a IDL. Všechny třídy lipoproteinů, které jsou oxidovány jsou potenciálně aterogenní. Vychází se z předpokladu, že tyto lipoproteinové partikule jsou schopny samy indukovat zánětlivou reakci v endotelu. HDL jsou jediným druhem lipoproteinů s protizánětlivým antioxidačním účinkem (Perušičová, 2009).

## **1.7 Diabetická dyslipoproteinémie**

Dyslipoproteinémie je metabolické onemocnění charakterizované koncentračními změnami plasmatických lipidů, které úzce souvisí s diabetem. Hlavními znaky jsou zvýšené hladiny TAG a LDL a snížená hladina HDL. Tyto změny v lipidovém metabolismu lze zachytit již mnoho let před diagnostikou hyperglykémie a lze je označit souhrnným názvem „lipidová triáda“. K výše popsaným změnám v lipidovém metabolismu přispívá mnoho faktorů. Mezi stěžejní faktory patří inzulínová rezistence a inzulínové deficiencie, dále adipokiny, hyperglykémie a obezita. I přes fakt, že zůstává několik aspektů patofyziologie

a následků diabetické dyslipidémie dosud neobjasněných, hlavní mechanismus vzniku hypertriacylglycerolémie je již objasněn.

Inzulínová rezistence (případně inzulínová deficeience) aktivuje hormon senzitivní lipázu, která zvýší uvolnění neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) z metabolicky aktivní centrální tukové tkáně. Zvýšená hladina cirkulujících mastných kyselin způsobí zvýšenou produkci triacylglycerolů játry. Zvýšená syntéza TAG játry je také asociována se zvýšenou sekrecí apolipoproteinu B (ApoB). Navíc fyziologický inhibiční účinek inzulínu na jaterní produkci ApoB a TAG (ve formě VLDL) je ztracen. Sekretované VLDL jsou větší a mají zvýšené zastoupení TAG. Tendence ke vzniku triacylglycerolémie je dále umocněna sníženým katabolismem VLDL partikulí. Lipoproteinová lipáza lokalizovaná v cévním endotelu determinuje rychlost odstranění TAG z krevního oběhu. Snížení aktivity lipoproteinové lipázy rovněž přispívá k postprandiálnímu zvýšení lipidů v krvi. Z toho plyne, že hladina TAG je významným indikátorem kardiovaskulárního rizika. Zvýšení hladiny TAG je předzvěstí budoucího rozvoje diabetes mellitus 2, zejména jsou-li přítomny další znaky metabolického syndromu.

Lipoproteiny s vysokým obsahem triacylglycerolů jsou aterogenní a zvyšují riziko kardiovaskulárního onemocnění při překročení triacylglycerolémie nad 2 g/l.

### **1.7.1 Terapie dyslipoproteinémie**

Pochopení normálního lipidového a lipoproteinového metabolismu je naprosto zásadní pro vývoj léčebných doporučení, které se zaměřují na dyslipoproteinémii u pacientů s DM 2. V první řadě je vždy kladen důraz na změnu životního stylu, což může mít příznivý vliv nejen na dyslipoproteinémii, ale také na ostatní rizikové faktory (hyperglykémii, hypertenzi). Změny životního stylu mají vždy dlouhodobý kladný efekt na zdraví pacienta, na rozdíl od farmakoterapie, kde je třeba pozitivní efekt léčiva zvažovat souhrnně i s případnými nežádoucími účinky.

#### **Nefarmakologická léčba**

Nefarmakologické intervence by měly zahrnovat úpravu stravovacích návyků – omezení denního příjmu tuků na 25 – 35 % celkového příjmu energie, přičemž důraz je kladen na převahu příjmu nenasycených mastných kyselin. Z hlediska dietních opatření je dále vhodné zvýšit příjem vlákniny (25 – 30 g/den), minimalizovat konzumaci alkoholu a dbát na příjem vitaminů (A, E, K) z přirozené formy obsažené v zelenině a ovoci. Opět se nabízí možnost nízkosacharidové diety stručně popsané v kapitole 1.3.3.

## **Farmakologická léčba**

Hypolipidemika jsou nasazována v případě, že je pacient ve vysokém riziku vzniku kardiovaskulární příhody. Základem farmakoterapie je dosažení cílové hodnoty LDL (ev. ApoB). Pokud se docílilo požadované hodnoty LDL cholesterolu a u pacienta přetrvává hypertriglyceridémie nebo snížený HDL cholesterol, zvažuje kombináční terapie (nejčastěji přidání fenofibrátu ke statinu). Monoterapie nestatinovým preparátem se indikuje pouze statin-intolerantním pacientům (Soška, 2015).

### **Statiny**

Statinová terapie je klíčová pro redukcí kardiovaskulárního rizika u osob s DM 2 a je považována za léčbu první volby dyslipoproteinémie. Statiny snižují LDL cholesterol inhibicí biosyntézy cholesterolu, výsledkem čehož je zvýšená clearance LDL partikulí. U inzulin rezistentních osob s dyslipoproteinémií mohou statiny taktéž snižovat VLDL sekreci a mohou snižovat tvorbu a sekreci lipoproteinů obsahujících ApoB. Výběr vhodného statinu se provádí dle toho, o kolik procent je nutné snížit hladinu LDL cholesterolu k dosažení stanovené cílové hodnoty.

### **Ezetimib**

Bylo potvrzeno, že ezetimiby mají obdobný efekt jako statiny, tedy snižují LDL cholesterol a tím dochází ke snížení kardiovaskulárního rizika.

### **Fibráty**

Léčba fibráty se doporučuje v případě nedosažení cílových hodnot TAG a HDL cholesterolu. Dochází ke zvýšení syntézy ApoA-I. Nejčastěji je doporučován pacientům s vysokými hladinami TAG a nízkým HDL cholesterolem.

### **Niacin**

V minulosti byl niacin užíván pro svůj kladný vliv na výrazné zvýšení HDL cholesterolu. Studie však dokládají mnoho vedlejších účinků, mezi nejzávažnější z nich patří vznik nebo zhoršení diabetes mellitus.

(Schofield, 2016), (Warraich, 2017), (Khavandi, 2017)

## **1.7.2 Obezita a dyslipidémie**

Obezitu lze považovat za pandemii moderní doby, je ve velké míře asociována s dyslipoproteinémií, která je řízena inzulinovou rezistencí a prozánětlivými adipokiny. Hlavní funkcí bílé tukové tkáně je uskladnění TAG po jídle a uvolnění mastných kyselin v době hladovění. Přibývání na váze způsobené nadměrným příjmem potravy současně

s nedostatečnou fyzickou aktivitou vede k nadváze až obezitě. Za těchto okolností dochází k hyperplazii a hypertrofii tukové tkáně, jejíž základní stavební jednotkou jsou adipocyty. Obezita je doprovázena infiltrací makrofágů do tukové tkáně a následně fenotypovým přepnutím makrofágů z protizánětlivých na prozánětlivé. Tyto změny ve složení tukové tkáně souvisí s pozměněnou sekrecí adipokinů a rozvojem jejich dysfunkce.

Nejčastější metabolickou poruchou u obézních pacientů je inzulínová rezistence, která je také hlavní příčinou vzniku dyslipoproteinémie. Dyslipoproteinémie je důležitým článkem mezi obezitou, rozvojem diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulárními onemocněními.

### **Metabolicky zdravá (MHO) a nezdravá obezita (MUO)**

Termínem metabolicky zdravá obezita (MHD) lze označit skupinu obézních pacientů bez zřejmých škodlivých následků jejich vysoké tělesné hmotnosti. Bylo navrženo několik definic MHO, které mohou být souhrnně označeny jako absence následujících metabolických poruch: abdominální obezita, hypertenze, dyslipidemie, hyperglykémie nebo inzulínová rezistence. Definovat metabolicky zdraví lze na základě přítomnosti jednoho nebo žádného znaku metabolického syndromu. Nejvíce posuzovanými parametry při rozlišení mezi MHO a pacienty s metabolicky nezdravou obezitou (MUO) jsou sérové lipidy. Dle dostupných dat mají pacienti s MUO menší velikost LDL částic, zvýšený poměr sdLDL partikulí, což je proaterogenní změna.

Obecně MHO pacienti mají méně ektopické abdominální tukové tkáně a nižší míru dysfunkčnosti adipocytů. Oproti tomu jedinci s MUO mají vyšší stupeň zánětu v tukové tkáni (Vekic, 2019).

## **1.8 Adipokiny**

Adipokiny jsou bioaktivní proteiny produkované bílou tukovou tkání, kterou z tohoto hlediska můžeme považovat za endokrinní orgán. Mají mnoho odlišných metabolických funkcí. Přímou řídit chuť k jídlu a výdej energie, částečně pak ovlivňují inzulínovou senzitivitu, funkci endotelu, hladiny lipidů a angiogenezi. Adipokiny regulují důležité biologické procesy jejichž cílem jsou mozek, játra, kosterní svalovina, imunitní systém a pankreas. To vysvětluje úzký vztah mezi obezitou a kardiovaskulárními onemocněními. U obézních pacientů je produkce a uvolnění adipokinů značně narušena, což vede k metabolickým poruchám, které jsou klíčové pro rozvoj inzulínové rezistence, diabetes mellitus 2. typu a souvisí se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem. Speciální důraz je kladen především na jejich zánětlivé hledisko. Změny v profilu adipokinů jsou zodpovědné za stav celé tukové tkáně. Hypertrofie může vést

ke vzniku hypoxických oblastí, což může podněcovat zánětlivou odpověď. Tento jev může významně změnit adipokinový profil. Adipokiny uvolněné buď z adipocytů nebo tukovou tkání infiltrovanými makrofágy jako odpověď na expanzi tukové hmoty jsou charakteristickým rysem obezity. Navíc vyvolávají mírný chronický zánět, inzulinovou rezistenci a mají aterogenní účinky (Leal, 2013).

Adipokiny nejsou původem pouze z adipocytů, ale také z ostatních buněk nacházejících se v tukové tkáni, které neobsahují jen adipocyty, ale také velké množství imunitních buněk (makrofágy, lymfocyty, granulocyty), endoteliální buňky a fibroblasty. Leptin a adiponektin jsou hlavně odvozeny od adipocytů, zatímco prozánětlivé cytokiny (IL-6, TNF- $\alpha$ ) jsou primárně produkovány makrofágy a buňkami imunitního systému.

Narušená produkce adipokinů a chronický mírný zánět tukové tkáně tvoří základ inzulinové rezistence, což je hlavní příčinou vzniku metabolické dyslipidemie u obézních (Fève, 2016).

### **1.8.1 Prozánětlivé adipokiny**

#### **Leptin**

Úloha leptinu se uplatňuje při regulaci příjmu potravy a energetického výdeje. Leptin má podobný efekt na lipidový metabolismus jako inzulin. Rovněž stimuluje makrofágovou sekreci TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12.

#### **Resistin**

Byl pojmenován podle své schopnosti vyvolat inzulinovou rezistenci. Resistin je schopný přímo poškodit endotel indukci adheze molekul do cévních stěn. Taktéž podněcuje syntézu a sekreci endotelinu (Leal, 2013).

#### **TNF- $\alpha$**

Zvětšené tukové buňky způsobují infiltraci makrofágů a dalších zánětlivých buněk. TNF- $\alpha$  je považován za ústřední faktor v aktivaci a infiltraci zánětlivých buněk.

#### **IL-6**

IL-6 je prozánětlivý adipokin produkován monocyty, fibroblasty a frakcemi útrobní tukové tkáně. Chronicky zvýšené hladiny IL-6 jsou nalézány u obézních lidí. Je asociován hypertriacylglycerolémií, protože stimuluje sekreci VLDL játry.

#### **IL-1**

IL-1 potlačuje aktivitu lipoproteinové lipázy, dále zvyšuje hladinu TAG v krvi.

## **1.8.2 Protizánětlivé adipokiny**

### **Adiponektin (AdipoQ)**

Hladina adiponektinu je negativně spojena s přítomností ektopického viscerálního tuku. Nízké hladiny adiponektinu jsou také asociovány s prevalencí diabetu 2. typu. Několik klinických studií zdokumentovalo asociaci mezi sníženými hladinami cirkulujícího adiponektinu a kardiovaskulárními nemocemi. Sníženou hodnotu adiponektinu mají pacienti s manifestovanou ischemickou chorobou srdeční v porovnání s kontrolní skupinou lidí stejného věku a BMI. Adiponektin stimuluje migraci a diferenciaci endotelových buněk do kapilár a předchází apoptóze endotelových buněk. V makrofázích potlačuje transformaci pěnových buněk a „přepíná“ jejich fenotyp z prozánětlivého na protizánětlivý. Celkově má tedy adiponektin protektivní účinky na kardiovaskulární systém (Shibata, 2017), (Sargolzaei, 2018).

### **Omentin 1**

Omentin I může v podkožním tuku zesilovat činnost inzulinu. Je spojován s down-regulací TNF- $\alpha$  vyvolaný expresí adhezivních molekul v endoteliálních buňkách. Proto je omentin považován za prospěšný z důvodu jeho protizánětlivé vlastnosti – zmírnění dysfunkce endotelu a aterosklerózy (Leal, 2013).

### **IL-10**

IL-10 je schopný inhibovat syntézu prozánětlivých adipokinů.

## **1.8.3 Nové adipokiny**

Mezi nově objevené adipokiny lze zařadit apelin, fibroblastový růstový faktor 21 a neuroregulin 4 účastníci se taktéž metabolických procesů. Zmíněné adipokiny jsou stále předmětem zkoumání mnoha studií, protože mají potenciálně příznivý terapeutický efekt. Společnými metabolickými efekty je kladný vliv na redukci váhy, ukládání tělesného tuku a zvýšení senzitivity pro inzulin. Léčba obezity má dlouhodobě omezenou efektivitu, a proto zůstává zásadním cílem vývoj nových antiobezitních terapeutických strategií. Adipokiny nabízí perspektivní vyhlídky pro prevenci s obezitou spojených nemocí. Adipokiny prokázaly potenciální vliv na regulaci chuti k jídlu, pocitu sytosti, energetického výdeje nebo chronického zánětu, proto představují primární cíle pro léčbu obezity a jejích komorbidit (Fève, 2016).

## 1.9 Kardiovaskulární komplikace diabetu 2. typu

Kardiovaskulární choroby zapříčiní zhruba polovinu úmrtí diabetiků. Zvýšený výskyt kardiovaskulárních komplikací u pacientů s DM 2 oproti zdravé populaci je prokázán řadou epidemiologických studií. Mortalita z kardiovaskulárních důvodů je u pacientů s diabetem několikanásobně vyšší než u nediabetické populace.

Již na počátku tohoto století se začal používat termín diabezita, který představuje úzký vztah mezi obezitou a diabetem. Obézní lidé mají až 90krát vyšší riziko, že u nich dojde k manifestaci DM 2. Podobnou analogii můžeme shledat u termínu kardiabetes, který poukazuje na spojitost KVO a diabetu. V literatuře se taktéž můžeme setkat s různými definicemi diabetu typu 2, které charakterizují DM 2 jako kardiovaskulární onemocnění s přítomností hyperglykémie, případně jako onemocnění cév s nepříznivou kardiovaskulární prognózou. Nepochybně se tedy nejedná o onemocnění vyznačující se pouze chronicky zvýšenou glykemií.

Manifestaci DM 2 předchází aterogenní změny, což naznačuje tomu, že je vhodné na aterosklerózu a diabetes nahlížet jako na dva stavy se společným původcem. Tímto společným původcem je inzulinová rezistence, na kterou má pravděpodobně stěžejní vliv hyperglykemie a oxidační stres. Oxidační stres má navíc podíl na rozvoji dysfunkce endotelu

Mezi nejčastější kardiovaskulární onemocnění patří ischemická choroba srdeční a akutní infarkt myokardu. Oproti zdravým lidem bez DM 2 se u diabetických pacientů vyskytují jistá specifika. Zmíněné kardiovaskulární komplikace jsou u nich 2 až 4krát častější, manifestují se již v mladším věku, průběh onemocnění je závažnější (delší hospitalizace i rekonvalescence), často doprovázen nespecifickými symptomy a vyšší mortalitou (Perušičová, 2009), (Takeda, 2010).

Dle místa postižení cévního řečiště je rozeznávána mikroangiopatie a makroangiopatie. Diabetická mikroangiopatie se týká postižení kapilár, venul a arteriol, které mohou vyústit v řadu komplikací (retinopatie, nefropatie, neuropatie). Pokud jsou postiženy velké cévy, jedná se o makroangiopatii, která se nedá odlišit od aterosklerózy. Ateroskleróza u diabetiků je závažnějšího charakteru a míra aterosklerotických komplikací koresponduje především s dobou přítomnosti diabetu (Broulíková, 2011).



### **1.9.1 Molekulární mechanismy srdečních patologií u diabetiků**

Metabolický srdeční profil diabetika je ovlivněn poruchou v množství cirkulující glukózy, inzulínu a mastných kyselin a změnami v signalizaci kardiomyocytů. Srdeční činnost je ovlivněna systémovými odchylkami zahrnující hyperglykémii, dyslipidémii a hyperinsulinémii (v případě DM 2), výsledkem čehož je pozměněná molekulární signalizace kardiomyocytu a poruchy metabolismu. Navíc zatížení organismu z důvodu obezity může vyvolat značný efekt na strukturní srdeční změny s následující poruchou funkce (Mandavia, 2013).

### **1.9.2 Stručný přehled kardiovaskulárních komplikací u diabetiků**

#### **A) Kardiovaskulární komplikace DM**

Na etiopatogenezi kardiovaskulárních komplikací u pacientů s diabetem má zásadní vliv endoteliální dysfunkce a hemostatické anomálie. Za fyziologického stavu je udržena homeostáza endotelu podporou vazodilatace, snížením zánětlivých procesů a předcházením trombotických stavů. Na rozvoji kardiovaskulárních onemocnění u diabetiků se podílí rovněž nekompensovaná hypertenze a dyslipoproteinémie.

- **Ischemická choroba srdeční (ICHS)**

ICHS je poškození srdeční funkce vznikající na základě nedostačujícího krevního zásobení srdečního svalu. Podkladem pro vznik tohoto stavu je ateroskleróza. Může se vyskytovat ve formě akutní nebo chronické.

- **Angina pectoris**

Angina pectoris je patologický stav vyznačující se bolestí na hrudníku. Bolest je způsobena dočasnou ischemií srdečního svalu, vyskytující se při onemocnění věnčitých tepen. Projevuje se zpravidla při fyzické námaze, kdy dochází k nerovnováze mezi spotřebou kyslíku a jeho nabídkou. Anginózní bolest signalizuje modifikace v koronárním řečišti a je třeba provést angiografické vyšetření tepen.

#### **B) Akutní koronární syndromy**

Nezvyklostí je, že u diabetiků se akutní koronární syndrom nemusí projevovat typickou svíravou bolestí na hrudi, nebolestivé infarkty myokardu jsou 2,5krát častější než u nediabetické populace. Pro diagnostiku akutních koronárních syndromů se používají biochemické markery (např. troponin, kreatinkináza).

- **Akutní infarkt myokardu**

AIM je částečná ischemická nekróza srdečního svalu vzniklá zúžením nebo dokonce uzávěrem věnčitých tepen zásobujících určitou oblast. Vzniká jako důsledek ruptury aterosklerotického plátu a následného vzniku trombózy.

### **C) Srdeční selhání**

- **Akutní srdeční selhání (ASS)**

Srdeční selhání je nejčastěji způsobeno ICHS. Dochází k narušení hlavní funkce srdce – regulace výdeje krve dle nároků organismu. Dle rychlosti propuknutí příznaků dělíme srdeční selhání na akutní a chronické, dle lokalizace poruchy na systolickou, diastolickou nebo smíšenou.

### **D) Diabetická kardiomyopatie (KMP)**

Diabetická kardiomyopatie se vyznačuje poruchou struktury a funkce myokardu, které jsou způsobeny metabolickými odchylkami u diabetických pacientů. Časným projevem diabetické KMP je diastolická dysfunkce, která může vyústit až v srdeční selhání.

### **E) Vaskulární onemocnění mozku**

- **Cévní mozková příhoda (CMP)**

CMP neboli iktus vzniká při uzávěru či snížení přívodu krve do mozku. Obliterace tepny způsobí nedostatečné prokrvení mozku, které se projeví typickými neurologickými potížemi (poruchy řeči, vidění, citlivosti končetin, spadlý ústní koutek). U diabetiků je průběh CMP závažnější, s vyšší mortalitou. Na rozvoj iktu u diabetiků má negativní vliv dysfunkce endotelu, zhoršená deformabilita červených krvinek z důvodu zvýšené glykace hemoglobinu. Co se týče lipidových anomálií, nepříznivě působí hypertriacylglycerolémie, hypercholesterolémie a změna v poměru lipoproteinových tříd.

(Rybka, 2007), (Varma, 2018)

## **1.9.3 Prevence KVO u diabetiků 2. typu**

Na metabolická i kardiovaskulární rizika specifická pro pacienty s DM je třeba nahlížet ve smyslu celkově zvyšující se náchylnosti k aterogenezi. Endoteliální povrch a funkce endotelu jsou negativně ovlivněny hyperglykemií, oxidačním stresem, protizánětlivými faktory a hyperkoagulační činností. V takovém prostředí pak snadněji působí další rizikové činitele. Tyto faktory na sebe navzájem působí, potencují, a je tak velmi obtížné zjistit, co je příčina a co následek.

Navzdory tomu, že se mortalita zapříčiněná KVO za poslední roky mírně snížila, u diabetiků tento pozitivní trend není pozorován. Výsledky studií však dokazují, že lze u diabetiků snížit riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění na úroveň nediabetické populace. Toho lze docílit jedině razantním zásahem do všech rizikových faktorů, protože pouze komplexním přístupem lze ovlivnit prognózu pacientů s DM 2. Jedná se hlavně o zabránění předčasného rozvoje aterosklerózy, jejíž příčiny specifické pro diabetes 2. typu jsou typicky hyperglykémie a inzulinová rezistence (Rybka, 2007).

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je separační metoda s plošným uspořádáním, u níž převládá adsorpční mechanismus dělení analyzované směsi. Separace látek se děje na základě různé pohyblivosti v systému dvou fází. To je charakterizováno retenčním faktorem, což je poměr vzdálenosti od startu ke středu skvrny a vzdálenosti, kterou urazila mobilní fáze od startu k čelu desky.

Stacionární (zakotvená) fáze je tenká vrstva nejčastěji ze skla nebo hliníku potažená sorbentem (silikagel, případně  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Mobilní (pohyblivou) fází tvoří zpravidla směs organických rozpouštědel. Na chromatografickou desku se nanáší malé množství vzorku ( $\mu\text{l}$ ) skleněnou kapilárou do dolní startovní oblasti. Tato tenká stacionární vrstva se ponoří do mobilní fáze tak, aby oblast aplikace analyzovaných vzorků zůstala nad mobilní fází. Pohyb mobilní fáze je způsoben kapilárními silami. Vyvíjení probíhá do té doby, dokud čelo vzlínající směsi rozpouštědel nedoputuje cca 1 cm k hornímu okraji desky. Vizualizace u bezbarvých analytů je možná pomocí detekčních činidel, které se váží na funkční skupiny separovaných látek a dochází k barevné změně. O jakou látku se jedná je možné zjistit díky tomu, že se na každou desku nanáší vzorek standardu, což je směs o známém složení. Pokud je shoda ve vzdálenosti skvrn standardu a vzorků od startovní pozice, jedná se o totožnou látku. Kvantitativní analýza se provádí denzitometricky nebo extrakcí z chromatogramu (extrakce do vhodného rozpouštědla a následné určení koncentrace v roztoku).

Reprodukovatelnost metody je nutné zajistit při každém měření stejným postupem přípravy a aplikace vzorku, nasycením vyvíjecí komory parami rozpouštědla a udržením konstantní teploty.

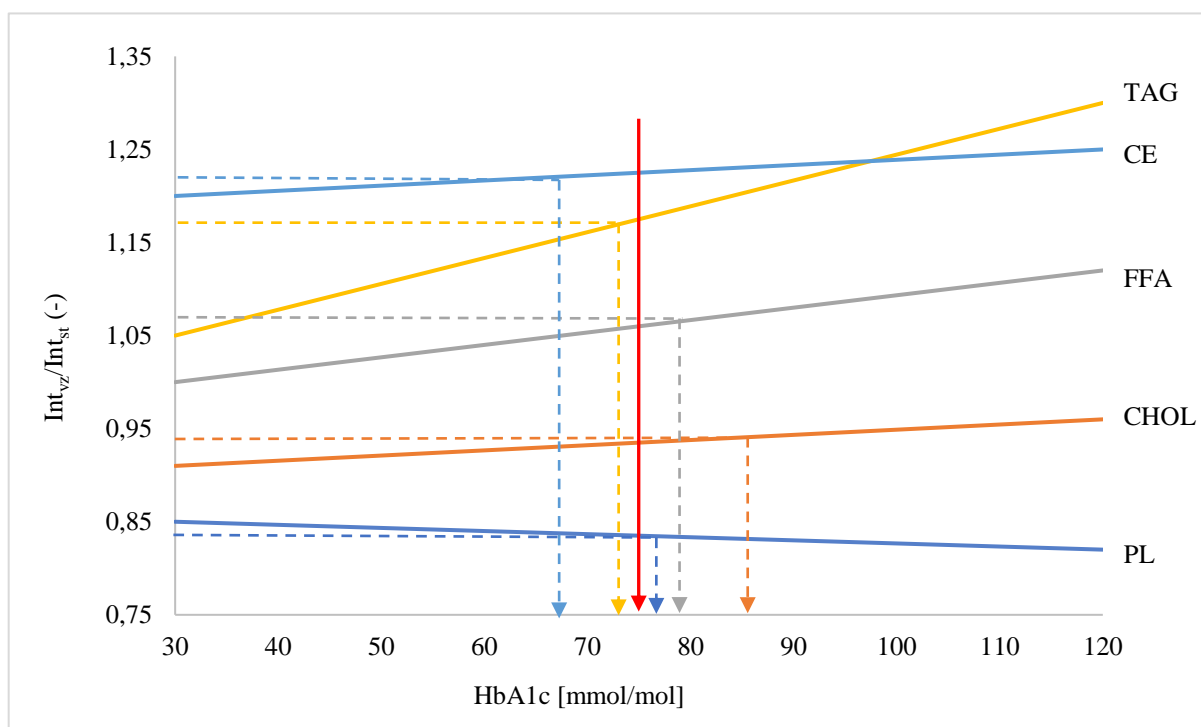
Mezi hlavní benefity TLC patří jednoduchost, díky níž může analýzu provádět i méně zkušený pracovník, ekonomická nenáročnost, využití metody pro poměrně široké množství analytů a také pro separaci více druhů vzorků současně. Na druhou stranu účinnost separace je poměrně nízká v porovnání s jinými dělicími technikami.

## 2.2 Cíl práce a předpoklad

V experimentální části této bakalářské práce jsem se zaměřila na závislost složení plazmatického lipidového spektra na koncentraci glykovaného hemoglobinu. Cílem práce bylo najít alternativní způsob semikvantitativního stanovení glykovaného hemoglobinu na základě lipidového spektra pomocí tenkovrstvé chromatografie a denzitometrické detekce. Dále jsem se zabývala otázkou, zda by bylo možné využít plazmatické lipoproteiny jako potenciální časné markery diabetu.

Bylo předpokládáno, že při porovnání vzorků diabetiků a zdravých dárců budou zjištěny rozdíly v jednotlivých lipidových frakcích. Dále jsme se domnívala, že nalezneme určité závislosti intenzit jednotlivých frakcí na glykovaném hemoglobinu.

Na Obr. 4 je schématické znázornění této představy v podobě grafu u pacientů s diabetem. U hodnot triacylglycerolů a volných mastných kyselin byl předpoklad jejich zvyšující se tendence, jelikož přímo souvisí s rozvojem a progresí inzulínové rezistence a tedy i s rozvojem DM 2. Ostatní frakce nejsou příliš prozkoumané, bylo cílem práce zjistit zda existuje nějaký trend, a proto je obrázek pouze ilustrativní. Šipkami je znázorněné, jak by bylo možné interpretovat výsledky.



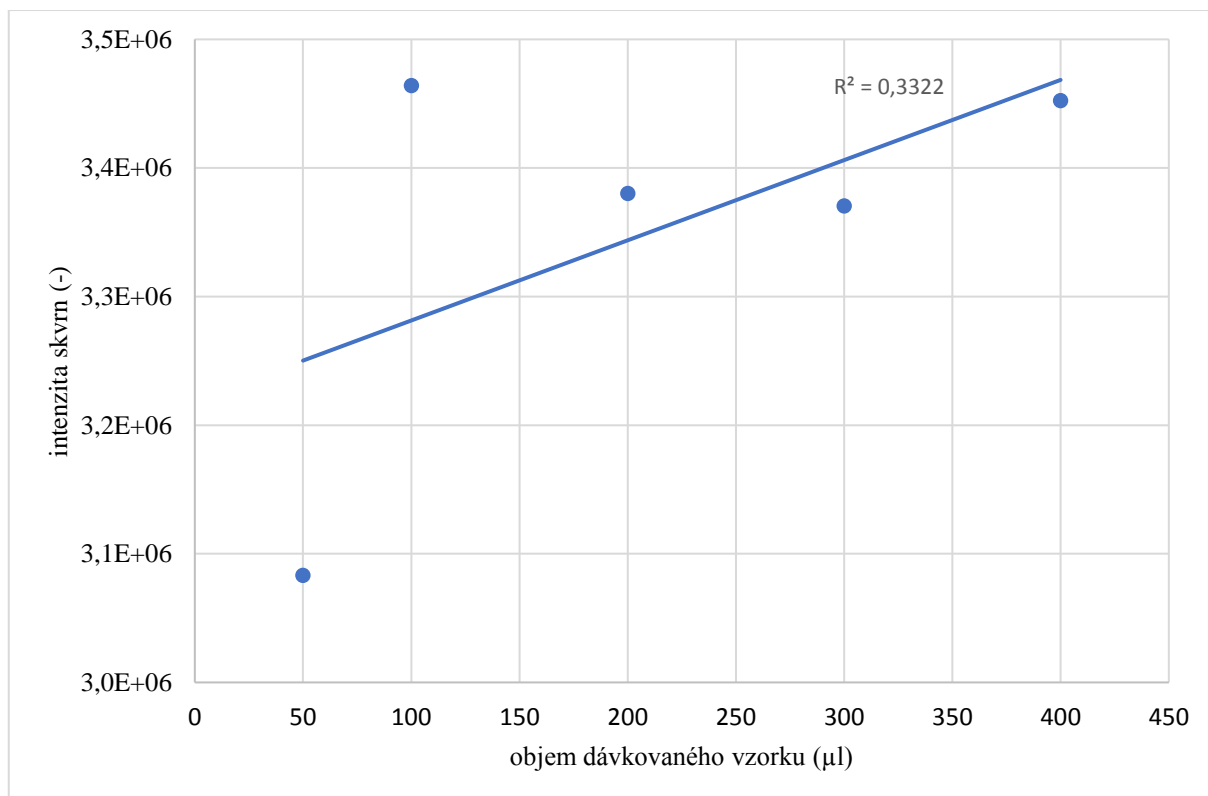
Obrázek 4 Předpokládané změny v lipidovém spektru

## 2.3 Preanalytická fáze

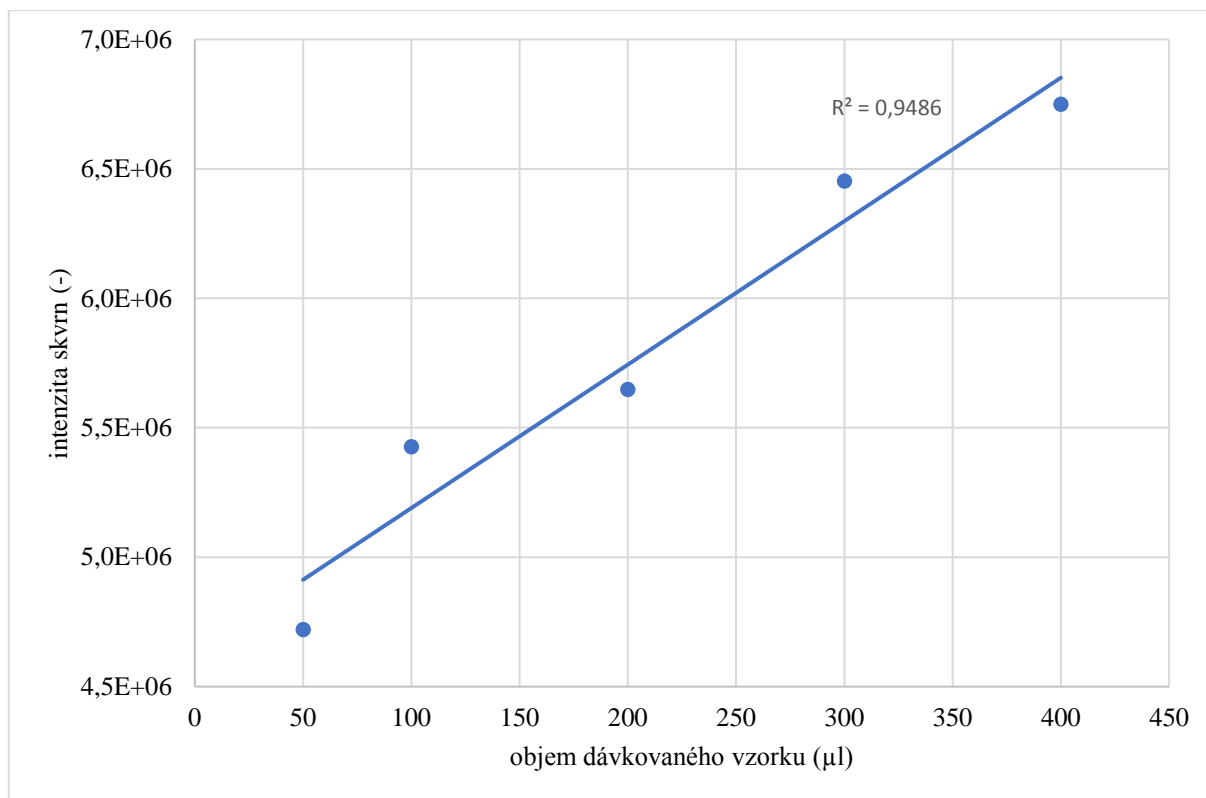
Samotné analýze diabetických a kontrolních vzorků předcházela série pokusných měření za použití vzorku pool plasmy. Bylo nutné optimalizovat dva hlavní aspekty – objem dávkované plazmy a způsob aplikace vzorku tak, aby bylo docíleno co nejpřesnějších a nejsprávnějších výsledků. Byla připravena kalibrační deska se stoupajícím množstvím nanášeného vzorku (100, 200, 300, 400, 500 a 600  $\mu\text{l}$ ). Při vyhodnocení bylo zjištěno, že se intenzita skvrny u většiny frakcí při objemu 600  $\mu\text{l}$  dostává mimo lineární oblast použité metody. Jako nejvhodnější nanášený objem plazmy se ukázalo množství 200  $\mu\text{l}$ , méně koncentrovaný vzorek poskytoval nedostatečně výrazné skvrny po denzitometrické analýze.

Dále jsem se zabývala způsobem aplikace vzorku. Vzorek byl nanášen ve formě teček do jednoho bodu a na druhou desku jako proužky. Jako jednotný optimální způsob aplikace vzorku byly zvoleny proužky (viz Obr. 7), jelikož na rozdíl od aplikace do jednoho bodu bylo dosaženo lepší linearitě metody zejména ve frakcích fosfolipidů a volných mastných kyselin. Ukázka rozdílné linearitě při dvojitým typu aplikace vzorku je zobrazena na Obr. 5 a Obr. 6.

Namísto klasického rozvržení desky tužkou byla vyrobena maska z polypropylenové fólie, která sloužila jako šablona pro nanášení vzorků. Tato šablona byla použita proto, že při denzitometrické analýze by čáry na desce zkreslovaly výsledek.



**Obrázek 5** Zobrazení kalibrační závislosti frakce fosfolipidů při aplikaci ve formě teček



Obrázek 6 Zobrazení kalibrační závislosti frakce fosfolipidů při aplikaci ve formě proužků

## 2.4 Seznam použitých chemikálií

Všechny použité chemikálie včetně jejich parametrů jsou uvedeny v Tab. 1 a Tab. 2.

Tabulka 1 Použité chemikálie

	chemikálie	ozn.
deproteinační roztok	isopropylalkohol, p.a.	1
	n-heptan, čistý	2
	kyselina trihydrogenfosforečná, p.a.	3
MF	n-hexan, p.a.	4
	diethylether, p.a.	5
	kyselina octová, p.a.	6
další chemikálie	methanol, p.a.	7
	toluen, p.a.	8
	chloroform, p.a.	9
detekční činidlo	kyselina fosfomolybdenová v ethanolu	10
standard pro TLC	pool plasma	11

**Tabulka 2** Parametry použitých chemikálií

ozn.	V (ml)	obsah (%)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	M (g/mol)	číslo šarže	výrobce
1	1000	99,8	780	60,1	PP/2015/12107	A
2	1000	100	680	100,21	PP/2010/14672	A
3	1000	85	1700	98	1801230113	B
4	1000	99	660	86,18	PP/2014/05928	A
5	1000	99,7	714	74,12	2203060317	B
6	1000	99	1050	60,05	1907280714	B
7	1000	99,8	791	32,04	2209270917	B
8	1000	99	867	138,21	PP/2017/09776	A
9	1000	99,8	1483	119,38	1611101111	B
10	500	20	940	1825,25	24859152	C
11	-	-	-	-	-	-

Legenda ke značení výrobců v Tab. 2:

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

B ... PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

C ... Sigma-Aldrich, Riedstraße 2, 89555 Steinheim am Albuch, Německo

## 2.5 Přístrojové vybavení

### 1. Třepačka Vortex REAX top

Výrobce: Heidolph instrumenst GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Strasse 12, 911 26 Schwabach, Německo

### 2. Centrifuga typ MPW-340

Výrobce: Mechanika Precyza, Polsko

Distributor: Servis Unimed, Vestec 41, 252 42 Vestec u Prahy, ČR

### 3. Termoblok a odpařovací zařízení: Pierce Reacti

Výrobce: THERMOSCIENCETIFIC, 28 Scheneck Parkway, Asheville, Severní Karolína 28803, USA

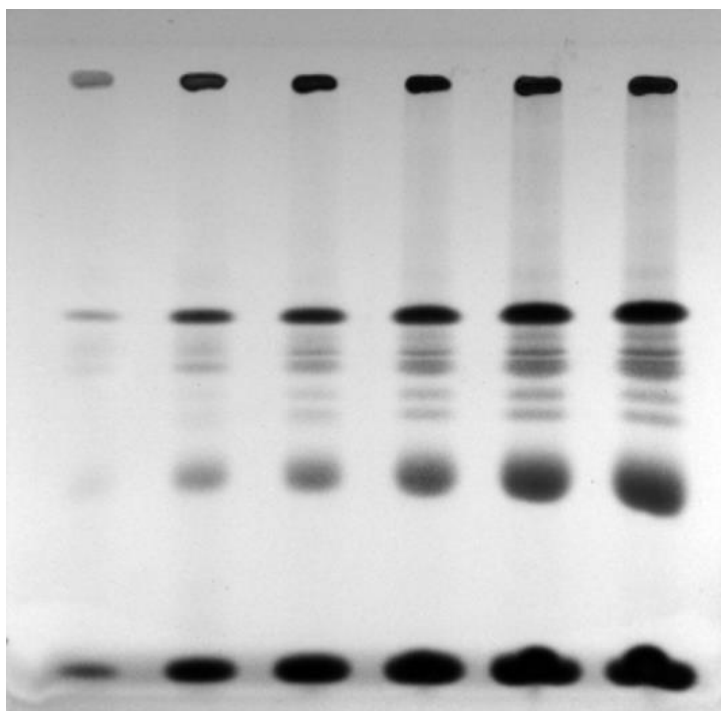
### 4. Denzitometr ChemiDoc XRS+

Výrobce: Bio-Rad, Kalifornie, USA

Vlastní denzitometrická analýza TLC desek byla provedena pomocí ChemiDoc XRS+, což je přístroj který slouží k pořízení obrazového záznamu hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Tento přístroj je určen především pro měření intenzity záření procházející



průhlednou vrstvou. V takové formě lze detekovat převážně proteiny, k jejichž analýze byl přístroj primárně navržen. Jelikož jsou ale k separaci lipidů pomocí tenkovrstvé chromatografie používány neprůhledné desky, bylo nutné v ovládacím softwaru nastavit horní přísvit a byl tak detekován odraz záření od analyzované desky a byla zaznamenána jeho intenzita. Výsledný obraz byl zpracován pomocí softwaru Image Lab (Bio-Rad, CA, USA). Zpracovaný signál jednotlivých separačních drah je následně v softwaru převeden do chromatografického zobrazení s píky, jejichž plocha je přímo úměrná množství stanovené látky.



**Obrázek 7** Kalibrační deska; nanášení vzorku ve formě proužků

## 2.6 Postup práce

K analýze bylo použito 20 vzorků plazmy pacientů s diagnostikovaným diabetes mellitus 2. typu a 20 kontrolních vzorků plazmy zdravých dárců. Vzorky o objemu 200  $\mu$ l byly deproteinovány 2,5 ml roztoku, který vznikl smísením 2-propanolu, n-heptanu a 2M kyseliny fosforečné v poměru 40:20:1. Vzniklá směs se nechala 10 minut kondicionovat při laboratorní teplotě. Byl přidán 1 ml směsi methanol : toluen (1:4) a 1,5 ml destilované vody. Směs byla promíchána ve vortexu a centrifugována 5 minut při 3000 otáčkách za minutu. Poté byla horní organická vrstva odpipetována (1,5 ml) a odpařena pod dusíkem při 50°C. Odparek byl rozpuštěn v 100  $\mu$ l směsi chloroform : methanol (2:1) a byl nanesen na připravenou chromatografickou desku. Při analýze bylo na každou desku nanášeno 5 vzorků a jeden standard ke korekci rozdílů intenzit mezi deskami. Celkem bylo průběžně připraveno

8 chromatografických desek, první polovina sloužila ke stanovení vzorků zdravých dárců, na druhou polovinu desek byly nanášeny vzorky diabetiků. Rozmístění jednotlivých vzorků na desky je znázorněné v Tab. 3. Jako standard byl použit vzorek pool plasmy. Mobilní fází byla směs 160 ml n-hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml kyseliny octové.

Pomocí tenkovrstvé chromatografie byl vzorek plasmy rozdělen na následující frakce: fosfolipidy (PL), cholesterol (CHOL), volné mastné kyseliny (FFA), triacylglyceroly (TAG) a estery cholesterolu (CE). Desky byly postříkány detekčním činidlem, kterým byla kyselina fosfomolybdenová v ethanolu. Následně byly desky umístěny do sušárny na 15 minut při teplotě 60°C. Ihned po vyndání byly desky vyfoceny pomocí denzitometru ChemiDoc XRS+, což dokumentuje Obr. 7.

Získaná data byla vyhodnocena v programu Image Lab, Microsoft Office Excel a Statistica 13.1.

**Tabulka 3** Rozmístění jednotlivých vzorků na chromatografické desky

číslo vzorku	linie 1	linie 2	linie 3	linie 4	linie 5	linie 6
<b>1.deska</b>	37	38	41	46	52	ST
<b>2.deska</b>	2U	3U	8U	14U	33	ST
<b>3.deska</b>	45	47	48	49	59	ST
<b>4.deska</b>	7	9	12	17	69	ST
<b>5.deska</b>	1	2	3	4	5	ST
<b>6.deska</b>	6	7	8	9	10	ST
<b>7.deska</b>	11	12	13	14	15	ST
<b>8.deska</b>	16	17	18	19	20	ST

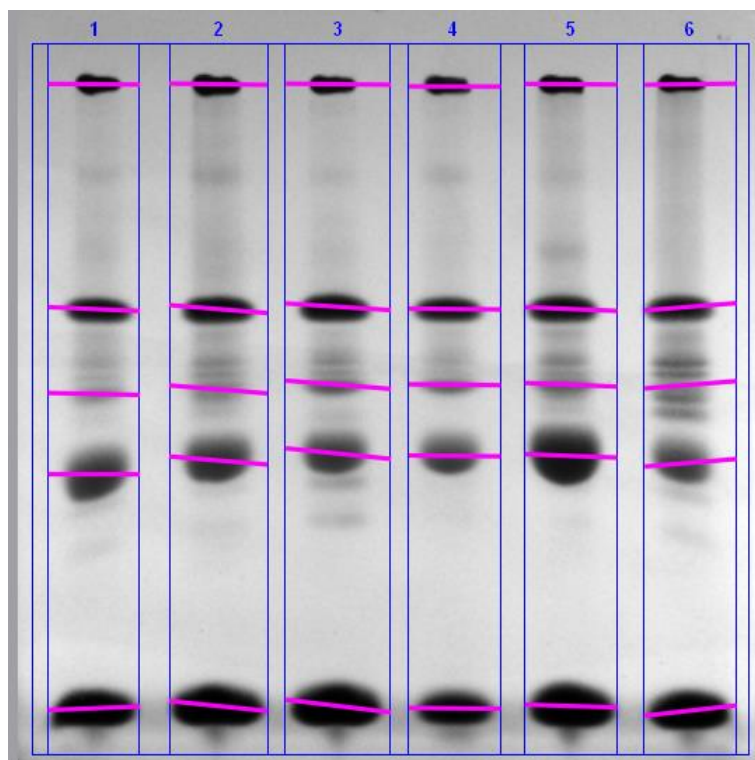
## 2.7 Výsledky a vyhodnocení

Obr. 8 demonstruje princip vyhodnocování jednotlivých chromatografických desek po denzitometrické analýze v programu ImageLab. Nejprve bylo nutné jednotlivé vzorky – sloupce jasně ohraničit tak, aby nedocházelo k překrývání skvrn mezi vzorky. Následně byly definovány lipidové frakce. Takto byly získány data pro vyhodnocení a další zpracování všech chromatografických desek. Program taktéž umožňuje zobrazit vyfocenou chromatografickou desku ve 3D formátu (viz Obr. 11) nebo jako chromatografický záznam (viz Obr. 12).

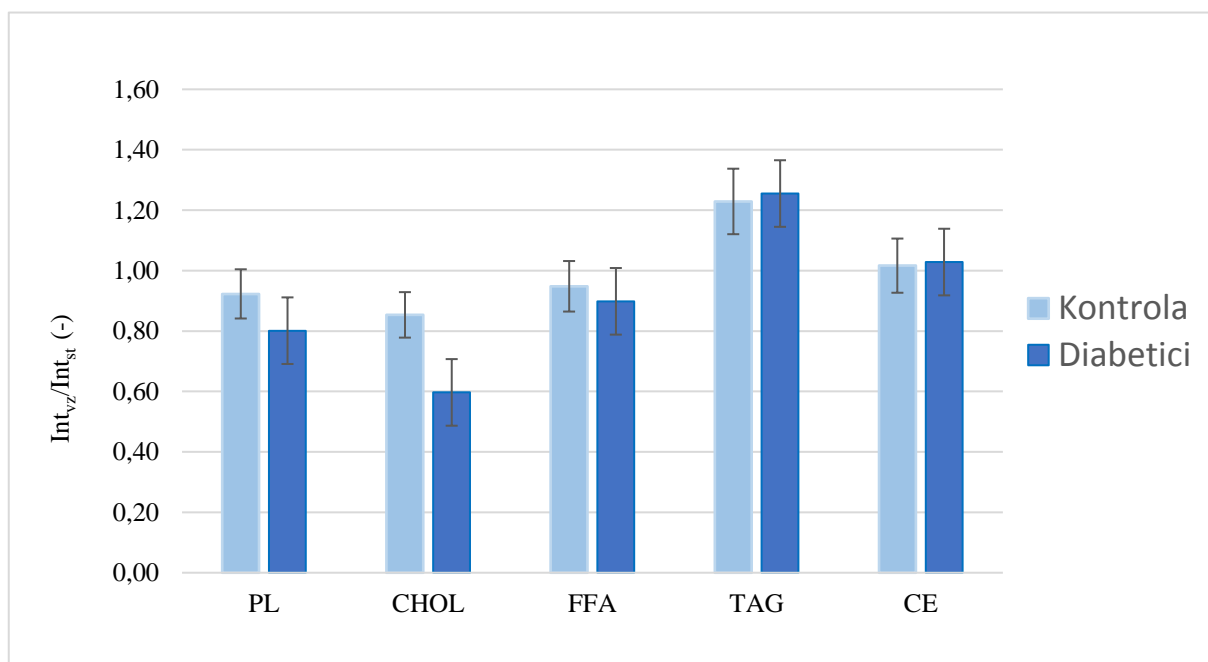
**Tabulka 4** Souhrnná výsledková tabulka diabetiků

<b>Pacient</b>	<b>HbA1c</b> [mmol/mol]	<b>PL</b>	<b>CHOL</b>	<b>FFA</b>	<b>TAG</b>	<b>CE</b>
<b>1</b>	48	0,859	0,526	0,908	1,465	0,997
<b>2</b>	48	0,984	0,655	1,038	1,315	1,223
<b>3</b>	50	0,914	0,732	1,105	1,081	1,254
<b>4</b>	53	0,918	0,549	0,907	0,967	0,835
<b>5</b>	64	0,999	0,648	1,044	2,055	1,212
<b>6</b>	70	0,772	0,749	1,221	1,890	1,004
<b>7</b>	73	0,723	0,640	0,982	1,905	1,349
<b>8</b>	87	0,758	0,685	0,936	1,478	0,999
<b>9</b>	94	0,816	0,665	1,058	1,584	0,997
<b>10</b>	36	0,452	0,467	0,477	0,775	0,455
<b>11</b>	40	0,727	0,520	0,841	0,880	0,838
<b>12</b>	44	0,763	0,543	1,153	1,818	0,995
<b>13</b>	47	0,727	0,543	0,896	1,264	1,069
<b>14</b>	50	0,644	0,448	0,859	0,888	1,008
<b>15</b>	55	0,809	0,529	0,916	1,230	1,017
<b>16</b>	59	0,904	0,695	0,801	1,133	1,540
<b>17</b>	63	0,946	0,638	0,763	1,104	0,939
<b>18</b>	61	0,671	0,537	0,756	0,814	0,833
<b>19</b>	63	0,907	0,533	0,803	1,231	1,013
<b>20</b>	72	0,911	0,677	0,699	0,740	0,984

V Tab. 4 jsou uvedeny výsledné intenzity jednotlivých frakcí diabetiků a hodnoty glykovaného hemoglobinu. Vzorek číslo 10 byl z vyhodnocování vyřazen, neboť již při přípravě vzorků k aplikaci na desku byl vizuálně naprosto odlišný od ostatních (svítivě žlutá barva). Po zpracování dat byly hodnoty intenzit jednotlivých frakcí výrazně sniženy. Chyby mohly nastat již při samotném odběru nebo následné manipulaci se vzorkem.

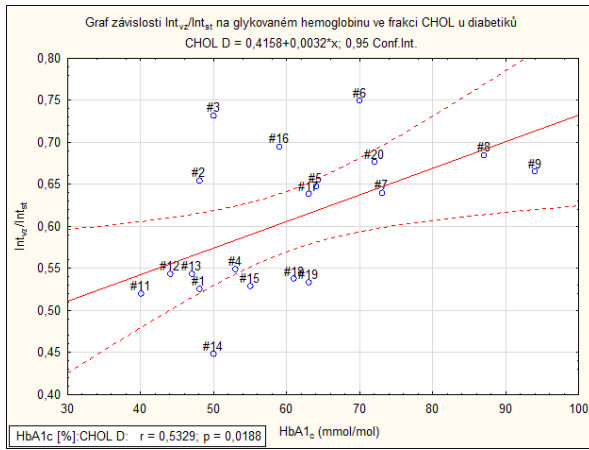


**Obrázek 8** Ilustrativní vyhodnocení 7. desky v programu ImageLab

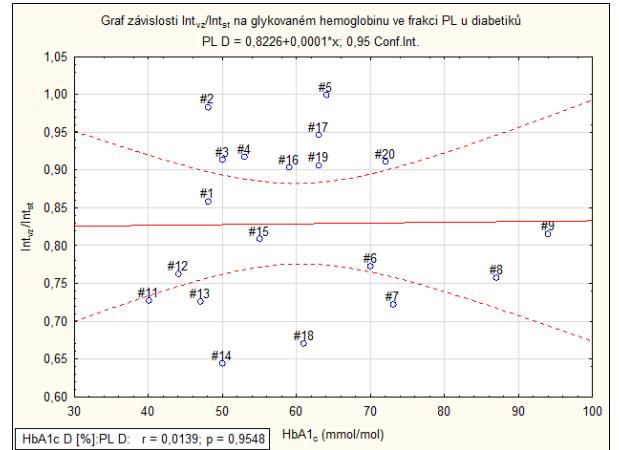


**Obrázek 9** Porovnání intenzit skvrn vzorků vztažených na intenzitu standardu mezi diabetiky a kontrolní skupinou v jednotlivých frakcích

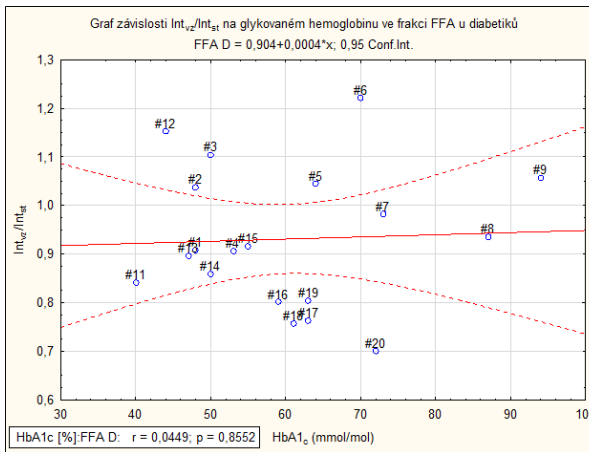
Na Obr. 9 můžeme sledovat rozdíly v intenzitách skvrn diabetiků a kontrolní skupiny u jednotlivých frakcích (vztažené na intenzitu standardu). Bylo zjištěno, že u diabetiků se snižuje hladina cholesterolu, což může být způsobené např. užíváním statinů. Navzdory tomu se cholesterol na glykovaném hemoglobinu zvyšuje. Znamená to, že diabetici s horší kompenzací diabetu mají i vyšší hladiny cholesterolu.



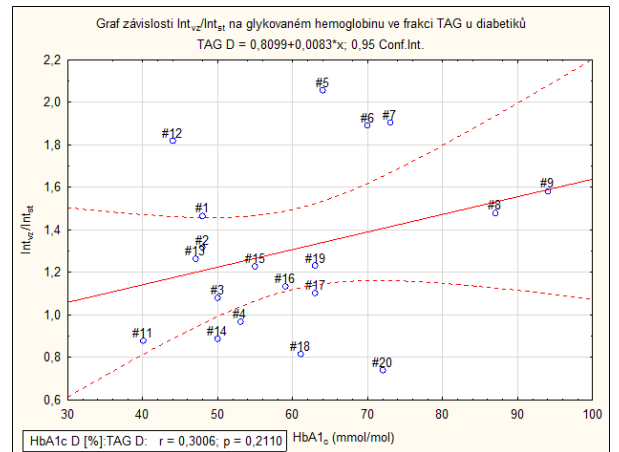
(a) CHOL



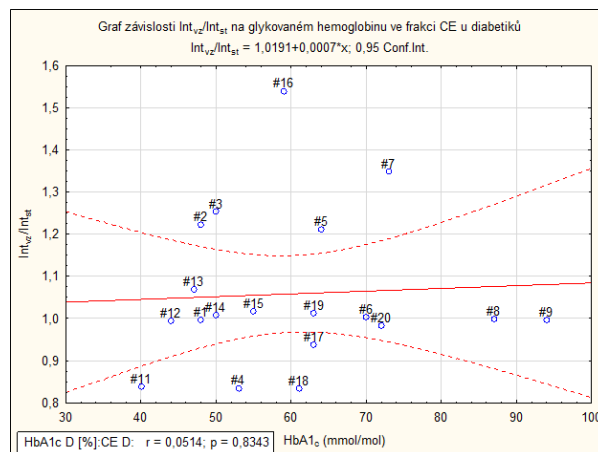
(b) PL



(c) FFA



(d) TAG



(e) CE

Obrázek 10 Statistická významnost jednotlivých lipidových frakcí

Různé intenzity lipidových frakcí (Tab. 4) byly zkoumány pomocí t-testu v programu Statistica 13.1. Pro jednotlivé lipidové frakce byly sledovány rozdíly jejich intenzit ztmavnutí u kontrolní skupiny a u skupiny diabetiků. Sledovali jsme hodnotu statistické významnosti  $p$  (Obr. 10), která byla počítána na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,050$ . Po provedení statistické analýzy získaných dat byl nalezen statisticky významný rozdíl frakce cholesterolu a fosfolipidů (Tab. 5), kde obě frakce byly u diabetiků sniženy, což můžeme pozorovat i na Obr. 9.

**Tabulka 5** Výsledková tabulka t-testu

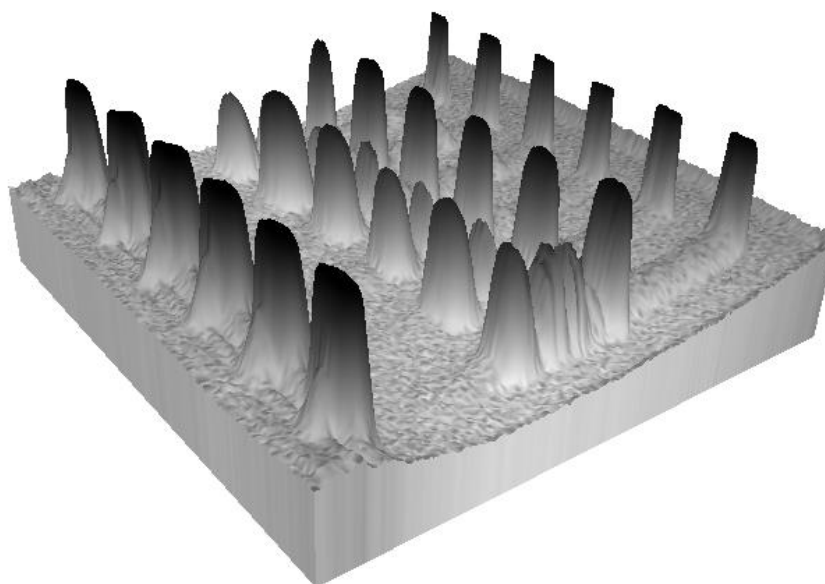
	<b>I<sub>D</sub></b>	<b>I<sub>K</sub></b>	<b>p</b>
PL	<b>0,828869</b>	<b>0,926986</b>	<b>0,003208</b>
CHOL	<b>0,605893</b>	<b>0,859905</b>	<b>0,000000</b>
FFA	0,930828	0,972394	0,506474
TAG	1,307397	1,249484	0,664134
CE	1,058260	1,027781	0,543285

Legenda k Tab. 5:

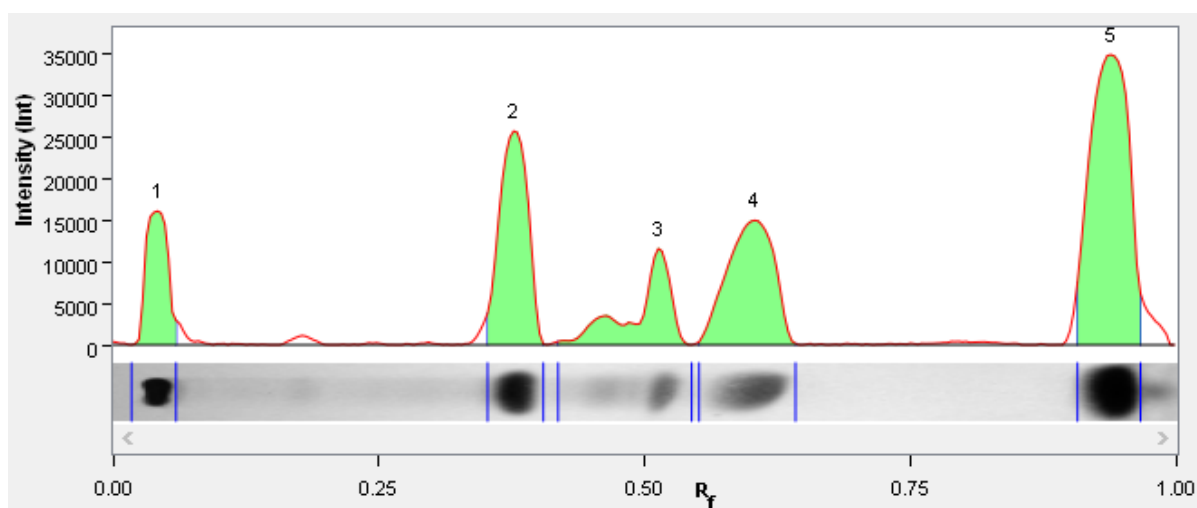
I<sub>D</sub> ... poměr intenzit vzorku diabetika a standardu

I<sub>K</sub> ... poměr intenzit vzorku kontrolní skupiny a standardu

p ... hladina významnosti



**Obrázek 11** 7.deska (vzorok pacientů s DM2) v 3D zobrazení



**Obrázek 12** Chromatografické zobrazení jedné linie (jeden pacient) na 7.desce se vzorky diabetiků

## 2.8 Závěr

Bylo analyzováno celkem 40 vzorků, polovina vzorků pocházela od zdravých dárců, druhá polovina byly vzorky diabetiků. Pomocí tenkovrstvé chromatografie byly získány jednotlivé lipoproteinové frakce a tyto složky byly následně detekovány denzitometricky po aplikaci kyseliny fosfomolybdenové jako detekčního činidla.

Při sestrojení závislostí podílu intenzit ztmavnutí skvrn jednotlivých frakcí vzorků a standardu na glykovaném hemoglobinu nebyly nalezeny žádné významné závislosti, kromě frakce cholesterolu, která se u diabetiků statisticky významně zvyšuje s rostoucím glykovaným hemoglobinem. Ukázalo se, že glykovaný hemoglobin není ideálním markerem pro posouzení lipidového metabolismu, protože nám udává především míru kompenzace diabetu. K hodnocení lipidového metabolismu jsou vhodnější data udávající BMI pacienta a ještě lépe obsah tuku v těle. Bylo zjištěno, že stanovení lipidového spektra pomocí tenkovrstvé chromatografie není vhodné pro semikvantitativní stanovení glykovaného hemoglobinu.

### 3 DISKUZE

Bylo zjištěno, že chromatografické dělení plazmatických lipidů na tenké vrstvě patří mezi standardní analytické techniky všeobecně využívané pro svoji jednoduchost, nenáročnost a dobrou reprodukovatelnost. Tato technika je využívána u nemocí, které mají původ, nebo souvislost s poruchami metabolismu lipidů, např. u dyslipoproteinémie, diabetu a kardiovaskulárních poruch a umožňuje jejich přesnější diagnostiku ze separovaných lipidových frakcí.

Frakce fosfolipidů a triacylglycerolů vznikají v hepatocytech a jsou játry vylučovány do cirkulace, volné mastné kyseliny pocházejí převážně z tukové tkáně, estery cholesterolu jsou difuzní skupinou lipidů, která převážně charakterizuje zpětný transport cholesterolu z periferie do jater, které ho pak vylučují formou žlučových kyselin. Je-li tento transport porušen, dochází ke změnám v zastoupení HDL a LDL cholesterolu, které pak způsobují kardiovaskulární onemocnění.

Jednotlivé lipidové frakce mohou být izolovány pomocí separační chromatografie na tenké vrstvě, a dále analyzovány pomocí kapalinové, plynové, nebo gelové chromatografie s různou finální detekcí např. FID, hmotnostní spektrometr, atd. Tyto přesné analytické techniky umožňují kvantifikaci všech tříd lipidů např. mastných kyselin, triacylglycerolů a fosfolipidů. Přestože tyto analytické postupy byly vyvinuty již v minulém století, jsou stále zdokonalovány a vybavovány moderní přístrojovou technikou, která umožňuje stanovení jednotlivých lipidových derivátů v mikro až nanogramových koncentracích.

Součástí teoretické práce bylo studium literárních pramenů zabývajících se problematikou diabetické dislipoproteinémie, jejich příčin, spojitosti s DM 2 a vznikem možných komplikací. Byla zmíněna terapie diabetu a dislipoproteinémie pomocí nízkosacharidové diety, která je v současnosti velmi diskutovaným tématem. Další zdroje, které by mohly toto téma více doplnit jsou např. (Meng, 2017) nebo (Feinman, 2015).

V souvislosti s aterosklerózou je třeba upozornit na častou mylnou domněnku laické veřejnosti o tom, že hlavní marker rizika KVO je hodnota celkového cholesterolu. Je zřejmé, že z hlediska aterogeneze je diagnosticky mnohem směrodatnější poměr v zastoupení LDL a HDL cholesterolu. Dále je pro posouzení kardiovaskulárního rizika klíčová hladina TAG a v neposlední řadě stanovení apolipoproteinu B.

Byla verifikována obecně známá skutečnost, že obezita má značně negativní vliv na metabolické zdraví, a to v souvislosti s pozměněnou sekrecí a funkcí adipokinů, zvýšenou



náchylností k IR či dislipoproteinémií. Všechny tyto faktory podněcují kardiovaskulární riziko, které je u pacientů s diabetem několikanásobně zvýšené. Pouze striktní terapie všech rizikových faktorů může vést k minimalizaci tohoto rizika a snížit mortalitu diabetiků na kardiovaskulární nemoci na úroveň odpovídající nediabetické populaci.

V praktické části práce byl studován lipidový profil diabetiků a zdravé kontrolní skupiny. Byla nalezena statisticky významná hladina u frakce cholesterolu a potvrzena hypotéza rostoucí koncentrace cholesterolové frakce s glykovaným hemoglobinem. Bylo prokázáno, že glykovaný hemoglobin přímo souvisí s hladinou glykémie, naopak bezprostředně nesouvisí s lipidovým metabolismem. Při našem předpokladu jsme nevzali v potaz, že metabolismus diabetiků 2. typu je velmi rychlý, oproti tomu glykovaný hemoglobin je dlouhodobý ukazatel průběhu diabetu, a nelze ho proto považovat za vhodný marker pro časný záchyt diabetu.

## 4 LITERATURA

BROULÍKOVÁ, Alena, 2011. Diabetes mellitus a cévní onemocnění. *Interní medicína pro praxi* [online]. 199-201 [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/05/04.pdf>

ELLIOTT, William a Daphne ELLIOTT, 2009. *Biochemistry and molecular biology*. 4th ed. New York: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-922671-9.

ERION, Derek, Hyun-Jun PARK a Hui-Young LEE, 2016. The role of lipids in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes and associated co-morbidities. *BMB Reports*. **49**(3), 139-148. DOI: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.268. ISSN 1976-6696.

FEINMAN, Richard, Wendy POGOZELSKI, Arne ASTRUP et al., 2015. Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: Critical review and evidence base. *Nutrition*. **31**(1), 1-13. DOI: 10.1016/j.nut.2014.06.011. ISSN 08999007.

FÈVE, Bruno, Claire BASTARD, Soraya FELLAHI, Jean-Philippe BASTARD a Jacqueline CAPEAU, 2016. New adipokines. *Annales d'Endocrinologie*. **77**(1), 49-56. DOI: 10.1016/j.ando.2016.01.001. ISSN 00034266. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003426616000020>

HAFIANE, Anouar a Jacques GENEST, 2015. High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clinical*. **3**, 175-188. DOI: 10.1016/j.bbacli.2015.01.005. ISSN 22146474. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214647415000069>

HOLČAPEK, Michal, Blanka ČERVENÁ, Eva CÍFKOVÁ et al., 2015. Lipidomic analysis of plasma, erythrocytes and lipoprotein fractions of cardiovascular disease patients using UHPLC/MS, MALDI-MS and multivariate data analysis. *Journal of Chromatography B*. **990**, 52-63. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.03.010. ISSN 15700232. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023215001725>

CHOU, Yu-Ching, San-Lin YOU, Chyi-Huey BAI, Yu-Chan LIAO, Cheng-Yu WEI a Chien-An SUN, 2019. Utility of apolipoprotein measurements in predicting incident type 2 diabetes: A Chinese cohort study. *Journal of the Formosan Medical Association*. DOI: 10.1016/j.jfma.2019.03.001. ISSN 09296646. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929664618307964>

KHAVANDI, Maryam, Francisco DUARTE, Henry GINSBERG a Gissette REYES-SOFFER, 2017. Treatment of Dyslipidemias to Prevent Cardiovascular Disease in Patients

with Type 2 Diabetes. *Current Cardiology Reports*. **19**(1). DOI: 10.1007/s11886-017-0818-1. ISSN 1523-3782. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11886-017-0818-1>

KLOUDA, Pavel, 2003. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-863-6907-2.

KODÍČEK, Milan, 2004. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 80-708-0551-X.

KVAPIL, Milan, 2013. *Diabetologie*. 2013. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-656-2.

LEAL, Viviane a Denise MAFRA, 2013. Adipokines in obesity. *Clinica Chimica Acta*. **419**, 87-94. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.003. ISSN 00098981. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898113000478>

MANDAVIA, Chirag, Annayya AROOR, Vincent DEMARCO a James SOWERS, 2013. Molecular and metabolic mechanisms of cardiac dysfunction in diabetes. *Life Sciences*. **92**(11), 601-608. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.10.028. ISSN 00243205. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320512006558>

MENG, Yan, Hao BAI, Shijun WANG, Zhaoping LI, Qian WANG a Liyong CHEN, 2017. Efficacy of low carbohydrate diet for type 2 diabetes mellitus management: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Research and Clinical Practice*. **131**, 124-131. DOI: 10.1016/j.diabres.2017.07.006. ISSN 01688227. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822717304023>

OPEKAR, František, 2010. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1775-6.

PELIKÁNOVÁ, Terezie a Vladimír BARTOŠ, 2011. *Praktická diabetologie*. 5., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-80-7345-244-5.

PERUŠIČOVÁ, Jindra, 2015. *Diabetes mellitus a kardiovaskulární onemocnění - kardiabetes*. 2015. Praha: Maxdorf. Současná diabetologie. ISBN 978-80-7345-428-9.

PERUŠIČOVÁ, Jindra a Richard ČEŠKA, 2009. *Kardiabetes*. 1. Brno: Facta Medica. ISBN 978-80-904260-1-6.

REUSCH, Jane a Cecilia WANG, 2011. *Cardiovascular Disease in Diabetes: Where Does Glucose Fit In?*. **96**(8), 2367-2376. DOI: 10.1210/jc.2010-3011. ISSN 0021-972X. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2010-3011>

ROSENBLIT, Paul, 2016. Common medications used by patients with type 2 diabetes mellitus: what are their effects on the lipid profile?. *Cardiovascular Diabetology*. **15**(1). DOI: 10.1186/s12933-016-0412-7. ISSN 1475-2840. Dostupné také z: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0412-7>

RYBKA, Jaroslav, 2007. *Diabetes mellitus- komplikace a přidružená onemocnění*. 2007. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1671-8.

SAINSBURY, Emma, Nathalie KIZIRIAN, Stephanie PARTRIDGE, Timothy GILL, Stephen COLAGIURI a Alice GIBSON, 2018. Effect of dietary carbohydrate restriction on glycemic control in adults with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*. **139**, 239-252. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.02.026. ISSN 01688227. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822717311713>

SARGOLZAEI, Javad, Elham CHAMANI, Tooba KAZEMI, Soudabeh FALLAH a Hosna SOORI, 2018. The role of adiponectin and adipolin as anti-inflammatory adipokines in the formation of macrophage foam cells and their association with cardiovascular diseases. *Clinical Biochemistry*. **54**, 1-10. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.02.008. ISSN 00099120. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912017311815>

SHIBATA, Rei, Noriyuki OUCHI, Koji OHASHI a Toyooki MUROHARA, 2017. The role of adipokines in cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*. **70**(4), 329-334. DOI: 10.1016/j.jjcc.2017.02.006. ISSN 09145087. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0914508717300606>

SCHOFIELD, Jonathan, Yifen LIU, Prasanna RAO-BALAKRISHNA, Rayaz MALIK a Handrean SORAN, 2016. Diabetes Dyslipidemia. *Diabetes Therapy*. **7**(2), 203-219. DOI: 10.1007/s13300-016-0167-x. ISSN 1869-6953. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13300-016-0167-x>

Size Exclusion Chromatography, 2011. *EBioWorld* [online]. [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: <http://www.ebioworld.com/2011/05/size-exclusion-chromatography-sec.html>

SOŠKA, Vladimír, 2015. Léčba dyslipidemie u pacientů s metabolickým syndromem. *Interní medicína pro praxi* [online]. 70-72 [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2015/02/05.pdf>

TAKEDA, Nobuakira, 2010. Cardiac disturbances in diabetes mellitus. *Pathophysiology*. **17**(2), 83-88. DOI: 10.1016/j.pathophys.2009.03.012. ISSN 09284680. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928468009000546>

VARMA, U., P. KOUTSIFELI, V.L. BENSON, K.M. MELLOR a L.M.D. DELBRIDGE, 2018. Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes – Experimental insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1864**(5), 1949-1959. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.10.035. ISSN 09254439. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092544391730412X>

VAVERKOVÁ, Hana, 2012. Význam stanovení apo B a A1 pro klinickou praxi. *Kardiologická revue - Interní medicína* [online]. [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2012-3/vyznam-stanoveni-apolipoproteinu-b-a-a-1-pro-klinickou-praxi-39551>

VEKIC, Jelena, Aleksandra ZELJKOVIC, Aleksandra STEFANOVIC, Zorana JELIC-IVANOVIC a Vesna SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, 2019. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*. **92**, 71-81. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.005. ISSN 00260495. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049518302440>

VON ZYCHLINSKI, Anne, Michael WILLIAMS, Sally MCCORMICK a Torsten KLEFFMANN, 2014. Absolute quantification of apolipoproteins and associated proteins on human plasma lipoproteins. *Journal of Proteomics*. **106**, 181-190. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.04.030. ISSN 18743919. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391914002061>

WARRAICH, Haider a Jamal RANA, 2017. Dyslipidemia in diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Cardiovascular Endocrinology*. **6**(1), 27-32. DOI: 10.1097/XCE.0000000000000120. ISSN 2162-688X. Dostupné také z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=01626549-201703000-00007>

WILSON, Ian, 2003. *Bioanalytical separations*. 4. New York: Elsevier. ISBN 04-445-0658-6.