

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Stanovení minoritních mastných kyselin v plazmě nemocných
adrenoleukodystrofií**

Diplomová práce

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

KONZULTANT PRÁCE: Ing. Bc. Martina Špryncová, Ph.D.

AUTOR PRÁCE: Bc. Lenka Česká

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Česká**
Osobní číslo: **C21444**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Stanovení minoritních mastných kyselin v plazmě nemocných adrenoleukodystrofií**
Téma práce anglicky: **Determination Of Minor Fatty Acids At Plasma Of Patients With Adrenoleukodystrophy**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na poruchy metabolismu mastných kyselin u nemocných adrenoleukodystrofií.
2. Popište metodiku stanovení významných lipidů a minoritních mastných kyselin pro diagnostiku adrenoleukodystrofie pomocí tenkovrstevné a plynové chromatografie.
3. Diskutujte vámi získané experimentální hodnoty a navrhněte možnou inovaci diagnostického postupu pro zlepšení diagnostiky adrenoleukodystrofie

Experimentální část:

1. U pacientů s prokázanou adrenoleukodystrofií a u kontrolní skupiny proveďte rozdělení EDTA plazmy do pěti tříd (fosfolipidy, diacylglyceroly, mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu) pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě.
2. Stanovte koncentrace minoritních mastných kyselin ve všech třídách lipidů pomocí plynové chromatografie.
3. Porovnejte koncentrace minoritních mastných kyselin a aktivity lipogenních enzymů ve všech třídách lipidů u nemocných a kontrolní skupiny. Vypracujte jejich závislosti na koncentracích vhodných rutinních klinicko-biochemických analytů (celkový cholesterol, HDL, LDL, triacylglyceroly atd.), nebo na vlastních koncentracích lipidů (celkové mastné kyseliny, celkové mononenasyčené mastné kyseliny, celkové ω -3 a ω -6 mastné kyseliny atd.)
4. Proveďte statistické vyhodnocení výsledků, přehledně je prezentujte pomocí grafů a obrázků a diskutujte jejich použitelnost pro inovaci diagnostiky adrenoleukodystrofie.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Gujral J., Sethuram S.: An update on the diagnosis and treatment of adrenoleukodystrophy, *Curr.Opp.Endocrinol.Diab.Obes.* 2023, vol. 30, no. 1, p. 44-51.
2. Turk B. R., Theda C., Fatemi A., Moser A. B.: X-linked adrenoleukodystrophy: Pathology, pathophysiology, diagnostic testing, newborn screening and therapies, *Int.J.Dev.Neurosci.*, 2020, vol. 80, no.1, p. 52-72.
3. Rattay T., Rautenberg M., Sohn A. S. et al.: Defining diagnostic cutoffs in neurological patients for serum very long chain fatty acids (VLCFA) in genetically confirmed X-adrenoleukodystrophy, *Sci.Reports*, 2020, vol. 4, no. 1, Article No. 15093.
4. Kemp S, Berger J, Aubourg P. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 2012, vol.1822, no. 9, p. 1465-74.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Ing. Martina Špryncová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlašuji, že diplomovou práci s názvem Stanovení minoritních mastných kyselin v plazmě nemocných adrenoleukodystrofií jsem vypracoval 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4.5.2023

Bc. Lenka Česká v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu prof. Ing. Alexanderovi Čeganovi, CSc. za jeho vedení, cenné rady, konstruktivní připomínky a za veškerý jeho věnovaný čas. Dále děkuji Ing. Martině Špryncové Ph.D. za pomoc, věcné rady a technické vedení při zpracování praktické části diplomové práce a za její trpělivost.

ANOTACE

Diplomová práce je zaměřena na problematiku diagnostiky adrenoleukodystrofie. Toto onemocnění se vyznačuje defektem metabolismu lipidů a peroxizomální β -oxidace, které následně způsobují akumulaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v plazmě a tkáních pacientů, především pak v mozku a nadledvinkách.

K analýze byla nejprve použita metoda tenkovrstvé chromatografie, pomocí které byly jednotlivé vzorky rozděleny do pěti lipidových frakcí. Následně byla stanovena koncentrace jednotlivých mastných kyselin ve všech frakcích pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. V této diplomové práci bylo celkem analyzováno deset vzorků plazmy pacientů, trpících adrenoleukodystrofií, a jedenáct kontrolních vzorků zdravých jedinců.

Biochemická laboratorní diagnostika adrenoleukodystrofie spočívá především ve stanovení koncentrace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a jejich poměrů. Cílem této práce však bylo zaměřit se na tzv. minoritní mastné kyseliny a určit, zda by se hodnoty koncentrací těchto mastných kyselin daly využít jako další biochemický marker adrenoleukodystrofie.

Na základě získaných dat bylo prokázáno, že stanovení některých minoritních mastných kyselin by mohlo být využíváno jako podpůrný diagnostický marker adrenoleukodystrofie.

KLÍČOVÁ SLOVA

adrenoleukodystrofie, mastné kyseliny, plynová chromatografie, β -oxidace

TITLE

Determination of minor fatty acids at plasma of patients with adrenoleukodystrophy.

ANNOTATION

The diploma thesis is focused on the issue of diagnosis of adrenoleukodystrophy. This disease is characterized by a defect in lipid metabolism and peroxisomal β -oxidation, which subsequently cause the accumulation of very long-chain fatty acids in the patient's plasma and tissues, primarily in the brain and adrenal glands.

For the analysis, the thin-layer chromatography method was used, when the individual samples were divided into five fractions. Subsequently, the concentration of individual fatty acids in all fractions was determined by gas chromatography with a flame ionization detector. In this thesis, ten plasma samples of patients suffering from adrenoleukodystrophy and eleven control samples of healthy individuals were analyzed.

The biochemical laboratory diagnosis of adrenoleukodystrophy primarily determines the concentration of very long-chain fatty acids and their ratios. However, the goal of this work was to focus on so-called minor fatty acids and to determine, whether the concentration values of these fatty acids could be used as other biochemical markers of adrenoleukodystrophy.

Based on the obtained data, it was determined that the determination of some minor fatty acids could be used as a supporting diagnostic marker of adrenoleukodystrophy.

KEYWORDS

adrenoleukodystrophy, fatty acids, gas chromatography, β -oxidation

OBSAH

Úvod.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Mastné kyseliny.....	16
1.1.1 Fyzikálně - chemické vlastnosti.....	16
1.1.2 Rozdělení mastných kyselin.....	16
1.1.3 Biosyntéza mastných kyselin.....	17
1.1.4 Odbourávání mastných kyselin.....	19
1.1.5 Peroxizomy a jejich funkce.....	20
1.1.6 MK jako součást lipidů a vyšších struktur.....	21
1.2 Adrenoleukodystrofie.....	23
1.2.1 Genetický aspekt.....	23
1.2.2 Klinické spektrum a formy ALD.....	24
1.2.3 Patogeneze a patofyziologie.....	26
1.2.4 Diagnostika.....	29
1.2.5 Prenatální diagnostika a novorozenecký screening.....	31
1.2.6 Terapie.....	32
1.3 Analýza vzorků mastných kyselin.....	34
1.4 Tenkovrstvá chromatografie.....	34
1.5 Derivatizace.....	35
1.6 Plynová chromatografie.....	36
1.6.1 Nosný plyn.....	37
1.6.2 Dávkovací zařízení.....	37
1.6.3 Termostat.....	38
1.6.4 Kolona.....	38
1.6.5 Detektory.....	39
1.6.6 Charakteristiky z chromatogramu.....	39

1.6.7	Trend spojení plynové chromatografie s MS analýzou.....	40
2	Cíl práce	41
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
3.1	Laboratorní vybavení	42
3.1.1	Přístroje	42
3.1.2	Pomůcky.....	42
3.2	Chemikálie a další materiál	43
3.2.1	Deпротеinační roztok	43
3.2.2	Mobilní fáze TLC.....	43
3.2.3	Další chemikálie.....	43
3.2.4	Detekční činidlo	44
3.2.5	Standard pro GC.....	44
3.2.6	Tlakové láhve	44
3.3	Pracovní postup	44
3.3.1	Analyzované vzorky.....	44
3.3.2	Příprava standardů a kalibrace	44
3.3.3	Extrakce lipidů a denaturace proteinů.....	45
3.3.4	Separace metodou TLC.....	45
3.3.5	Derivatizace, převedení na methylestery	46
3.3.6	Separace metodou GC.....	47
3.3.7	Analýza výsledků	47
4	VÝSLEDKY	48
4.1	Soubor pacientů a zdravých kontrol	48
4.2	Stanovované mastné kyseliny	48
4.3	Minoritní mastné kyseliny	49
4.4	Kyselina myristová (14:0) a její hodnoty	49
4.5	Kyselina pentadekanová (15:0) a její hodnoty	51

4.6	Kyselina sapienová (16:1 n-10) a její hodnoty	54
4.7	Kyselina <i>cis</i> palmitoolejová (16:1 n-7) a její hodnoty	56
4.8	Kyselina <i>cis</i> vakcenová (18:1 n-7) a její hodnoty	58
4.9	Kyselina oktadekadienová (18:2 – 9Z, 11E) a její hodnoty	61
4.10	Kyselina oktadekadienová (18:2 – 10Z, 12Z) a její hodnoty	63
4.11	Kyselina eikosapentaenová (20:5 n-3) a její hodnoty.....	65
5	DISKUZE.....	68
6	ZÁVĚR	78
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	80

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Řetězec mastné kyseliny.....	17
Obrázek 2: Elongace MK a porucha metabolismu VLCFA [11].....	28
Obrázek 3: TLC jednotlivých lipidových frakcí [1]	35

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Hodnoty kyseliny myristové.....	49
Graf 1: Hodnoty kyseliny myristové - pokračování.....	50
Graf 2: Statistika kyseliny myristové.....	50
Graf 2: Statistika kyseliny myristové - pokračování.....	51
Graf 3: Hodnoty kyseliny pentadekanové.....	52
Graf 4: Statistika kyseliny pentadekanové.....	53
Graf 5: Hodnoty kyseliny sapienové.....	54
Graf 5: Hodnoty kyseliny sapienové - pokračování.....	55
Graf 6: Statistika kyseliny sapienové.....	55
Graf 6: Statistika kyseliny sapienové - pokračování.....	56
Graf 7: Hodnoty kyseliny <i>cis</i> palmitoolejové	56
Graf 7: Hodnoty kyseliny <i>cis</i> palmitoolejové - pokračování	57
Graf 8: Statistika kyseliny <i>cis</i> palmitoolejové	57
Graf 8: Statistika kyseliny <i>cis</i> palmitoolejové - pokračování	58
Graf 9: Hodnoty kyseliny <i>cis</i> vakcenové	59
Graf 10: Statistika kyseliny <i>cis</i> vakcenové	60
Graf 11: Hodnoty kyseliny oktadekadienové.....	61
Graf 11: Hodnoty kyseliny oktadekadienové - pokračování.....	62
Graf 12: Statistika kyseliny oktadekadienové.....	62
Graf 12: Statistika kyseliny oktadekadienové - pokračování.....	63
Graf 13: Hodnoty kyseliny oktadekadienové (Z).....	63
Graf 13: Hodnoty kyseliny oktadekadienové (Z) - pokračování	64
Graf 14: Statistika kyseliny oktadekadienové (Z).....	64
Graf 14: Statistika kyseliny oktadekadienové (Z) - pokračování.....	65
Graf 15: Hodnoty kyseliny eikosapentaenové	66
Graf 16: Statistika kyseliny eikosapentaenové	67

SEZNAM ZKRATEK

AAV9	adeno-asociovaný virus 9
ABCD1	transmembránový receptor, gen pro transmembránový receptor
ACAT1	cholesterol acyltransferáza 1
ACP	protein přenášející acylové skupiny (acyl carrier protein)
ALD	adrenoleukodystrofie
ALDP	adrenoleukodystrofický protein
AMN	adrenomyelopatie
AMP-K	proteinkináza závislá na adenosinmonofosfátu
ATP	adenosintrifosfát
CF	mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid)
CNS	centrální nervová soustava
Cys-SH	periferní cysteinový zbytek
DG	diacylglyceroly
ECH	estery cholesterolu
ELOVL1	elongáza mastné kyseliny 1 (elongation of very-long-chain-fatty acids)
FAME	methylestery mastných kyselin (fatty acid methyl ester)
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
FID	plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HCT	transplantace kmenových buněk
IL-6	interleukin 6
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

LCAT	lecitin-cholesterol acyltransferáza
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long chain fatty acids)
MCFA	mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (medium chain fatty acids)
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spektrometry)
MRI	magnetická rezonance
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acid)
NADPH	nikotinamidadeninindinukleotidfosfát
NfL	neurofilamentní řetězec
Pan-SH	centrální 4'-fosfopantetheinová skupina
PC	fosfatidylcholin
PL	fosfolipidy
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PLA2	fosfolipáza A2
PLOT	kolona s absorbentem na vnitřní stěně kapiláry
PUFA	polynenasyčené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acid)
RS	roztroušená skleróza
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids)
SOD	superoxiddismutáza
TG	triacylglyceroly
TCD	tepelně vodivostní detektor (thermal conductivity detector)
TID	termoionizační detektor (thermal ionization detector)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)

TMSH	trimethylsulfoniumhydroxid
TNF- α	faktor nekrotizující nádory
VLCFA	mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (very long chain fatty acids)
VM	volné mastné kyseliny
UV	ultrafialové záření
WCOT	kolona s kapalinou zakotvenou na vnitřní stěně kapiláry
X-ALD	na chromozom X vázaná adrenoleukodystrofie

ÚVOD

Adrenoleukodystrofie je nejčastější peroxizomální dědičná porucha lipidového metabolismu, s incidencí přibližně 1 : 16 000. Nemoc se plně manifestuje převážně u mužů, u postižených žen se onemocnění projevuje mírnější formou. Tato porucha je způsobena přítomností mutace v genu pro ABCD1 transmembránového receptoru, který je lokalizován na chromozomu X. Dochází k odchylce metabolismu lipidů, konkrétně v peroxizomální β -oxidaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA). Následně dochází ke kumulaci VLCFA v plazmě a tkáních pacientů. Nejvíce postižené jsou tkáně centrálního nervového systému a nadledvinky, kde nahromaděné VLCFA způsobují neurodegeneraci, demyelinizaci, adrenální insuficienci a další projevy tohoto onemocnění. Prognóza u adrenoleukodystrofie je bez včasné diagnostiky a terapie velmi nepříznivá.

Diagnostiku adrenoleukodystrofie je možné v současné době provést několika způsoby. Mezi zobrazovací techniky patří například magnetické rezonance mozku. Dále je možné diagnostikovat adrenoleukodystrofii biochemickým stanovením koncentrace VLCFA v plazmě postižených pacientů, která se převážně určuje metodou plynové chromatografie. Diagnóza může být také určena použitím molekulárně biologických metod, jako je sekvenace nebo polymerázová řetězová reakce, kdy je přímo vyšetřován gen pro ABCD1 receptor.

Adrenoleukodystrofie se projevuje hlavně u mužů, ale pro ženy přenašečky ve fertilním věku představuje prenatalní diagnostika zásadní výhody z důvodu zjištění, zda plod zdědil mutaci v genu ABCD1. Tato informace může být následně rozhodující v otázce umělého ukončení těhotenství. Také novorozenecký screening je podstatný pro včasnou diagnostiku adrenoleukodystrofie z důvodu možnosti včasného zavedení adekvátní léčby, protože včasná diagnostika a zavedení terapie je u tohoto onemocnění velmi důležitá a může zvýšit šanci na přežití a ovlivnit následnou kvalitu života pacientů. Zavedení novorozeneckého screeningu je proto vysoce podporováno.

V posledních několika letech došlo k významným pokrokům ve výzkumu geneticky vázaných a neurologických chorob, přesto však zatím zůstávají určité mechanismy a procesy neznámé a jejich výzkum zdaleka není u konce. Studie ohledně adrenoleukodystrofie se nyní zabývají různými možnostmi léčby, jako je například genová terapie, a určením dalších nových diagnostických a prognostických markerů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou jedním ze stavebních kamenů lipidů. Přirozeně se vyskytující mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s nerozvětveným uhlovodíkovým řetězcem, který obsahuje od 2 do 36 uhlíků. Ve vazbě s dalšími látkami se vyskytují ve formě esterů, malé množství mastných kyselin, které nejsou esterifikovány se označují jako volné mastné kyseliny. MK jsou díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem základní složkou lipidů a jsou často zabudovávány i do vyšších organizovaných struktur. [1, 2, 3]

1.1.1 Fyzikálně - chemické vlastnosti

MK mají tzv. amfifilní charakter, kdy jejich hydrofobní část je tvořena uhlovodíkovým řetězcem a hydrofilní karboxylovou skupinou. S rostoucí délkou řetězce klesá rozpustnost MK ve vodě. Ve vodném prostředí tudíž tvoří micely, kdy směrem k vodnému prostředí jsou MK natočené hydrofilní karboxylovou částí. Bod tání MK určuje délka řetězce a počet dvojných vazeb, kdy s rostoucí délkou řetězce se bod tání zvyšuje a s rostoucím počtem dvojných vazeb klesá. [2]

1.1.2 Rozdělení mastných kyselin

U živočichů a ve vyšších rostlinách se vyskytují především nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, které obsahují 16 nebo 18 uhlíků (např. kyselina palmitová a stearová). Kyseliny s řetězcem kratším než 14 a delším než 22 uhlíků v řetězci představují minoritní část. Z důvodu biosyntézy MK mají přirozeně se vyskytující mastné kyseliny, až na výjimky, sudý počet uhlíkových atomů. V lidské plazmě a v lidských tkáních bylo identifikováno cca 60 různých mastných kyselin, jen některé z nich jsou ale biologicky a diagnosticky relevantní. Pro jednotlivé živočišné druhy i jednotlivé tkáně je charakteristický určitý panel zastoupení mastných kyselin. [1, 2]

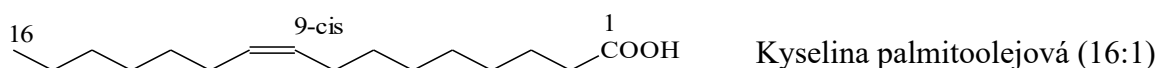
Nasycené MK obsahují ve svém uhlíkatém řetězci pouze jednoduché vazby. MK, obsahující jednu či více izolovaných dvojných vazeb, se označují jako kyseliny nenasycené. Mononenasycené mastné kyseliny se označují zkratkou MUFA a polynenasycené zkratkou PUFA. Dvojně vazby mohou tvořit v řetězci mastných kyselin *cis* nebo *trans* konformaci.

V přirozeně vyskytujících se lipidech je ve valné většině forma *cis*, která způsobuje ohyb řetězce pod úhlem 60°. Často vyskytující se nenasycené mastné kyseliny jsou kyselina olejová a linolová. Mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem jsou schopny tvořit pouze bakterie. [1, 2]

Některé mastné kyseliny nazýváme esenciální, protože tyto MK si lidský organismus nedokáže syntetizovat a je tedy nutné je přijímat z potravy. Jedná se především o nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami. Důležitým zástupcem této skupiny je kyselina arachidonová, která obsahuje 20 uhlíků a čtyři dvojně vazby. Dále pak osmnácti uhlíkaté kyseliny – linolová a linolenová. [1, 2]

Dále je možné rozdělit MK do skupin podle délky řetězce, a to hlavně kvůli jejich rozdílnému chování v metabolismu. Kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), které obsahují tři až šest uhlíků (C3-C6), středně dlouhým řetězcem (MCFA) obsahující (C8-C10), dlouhým řetězcem (LCFA) obsahující (C12-C18) a velmi dlouhým řetězcem (VLCFA) obsahující (> C18). [1, 2]

K zápisu struktury řetězce MK se používají zkrácené číselné tvary např. 18:2; 9,12. Kdy číslo 18 představuje počet uhlíků, číslo 2 počet dvojitých vazeb, čísla 9 a 12 dále pozici dvojných vazeb. Uhlíkatý řetězec MK se z pravidla čísluje od uhlíku, který nese karboxylovou skupinu (C-1). Pro značení řetězce se také používají řecká písmena, kdy α = C-2. Symbol ω se používá pro značení posledního uhlíku řetězce. Když se vyskytne symbol ω -3, jedná se o třetí uhlík od konce řetězce. [1, 2]



Obrázek 1: Řetězec mastné kyseliny

1.1.3 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza MK probíhá v cytosolu enzymaticky, především v játrech a tukové tkáni, kdy základními stavebními kameny je glukóza, potažmo acetyl-CoA. Vlastní syntéza probíhá cyklicky za katalýzy multifunkční syntázou mastných kyselin (FAS) na principu podobné opačné β -oxidaci, kdy se využívá k redukční reakci místo NADH molekula NADPH, která je do systému dodávána reakcemi pentózového cyklu. Klíčovým enzymem je acetyl-CoA-karboxyláza, jejíž aktivitu ovlivňuje hladina inzulínu. Acetyl-CoA-karboxyláza se aktivuje defosforylací a proteinkináza závislá na adenosinmonofosfátu (AMP-K), má schopnost

ji deaktivovat. Na její aktivitu mají vliv i další látky, jako je např. citrát. Ten svým alosterickým působením aktivuje acetyl-CoA-karboxylázu a naopak palmitoyl-CoA, jako koncový produkt dráhy ji alostericky inhibuje. U obratlovců se struktura kompaktního enzymatického systému, syntázy mastných kyselin, skládá z dvou identických peptidových řetězců, který tvoří dimer do tvaru písmene X. Tento dimer katalyzuje všech sedm reakcí syntézy. Každá podjednotka je schopná vázat acylové zbytky pomocí thioesterové vazby na dvou různých -SH skupinách, a to na periferní cysteinový zbytek (Cys-SH) a na centrální 4'-fosfopantetheinovou skupinu (Pan-SH). FAS je funkční pouze ve stavu dimeru. Jeho podjednotky jsou spojeny centrálním Pan-SH, který obsahuje koenzym A, a je kovalentně vázán na bílkovinnou část řetězce enzymu. Tato kovalentní vazba se označuje jako acyl-carrier protein (ACP) a slouží k předávání substrátu z jednoho reakčního centra do druhého. Bez tohoto přenosu by syntéza MK pomocí FAS nebyla možná, a proto je funkční jen jako dimer. Díky tomu, že všechny reakce probíhají postupně a koordinovaně pomocí multifunkčního enzymu FAS nedochází při syntéze k spotřebovávání produktů v jiných metabolických reakcích a reakce syntézy MK jsou přesné a účinné. Toto uspořádání přináší výhody oproti jednotlivým samostatně fungujícím enzymům. Prvním krokem syntézy je navázání acetylového zbytku na periferní Cys-SH skupinu a současně navázání malonyl-CoA na centrální Pan-SH skupinu. V dalším kroku dochází k prodloužení řetězce kondenzací acetylového zbytku na malonylovou skupinu. Následuje redukce 3-oxoskupiny, dehydrogenace 3-hydroxyacylu a jeho další redukce. Závěrečným krokem je pak hydrolytické odštěpení produktu. Koncovým produktem tohoto cyklu je nasycená kyselina s šestnácti uhlíky, tudíž kyselina palmitová, která se následně může přeměňovat na další MK. [1, 2, 4]

Vzájemná přeměna MK může probíhat několika způsoby. Může dojít ke zkracování MK, prodlužování (např. z kyseliny palmitové vznikne kyselina stearová) nebo vytváření dvojných vazeb. (např. z kyseliny stearové vznikne dehydrogenací nenasyčená kyselina olejová). Prodlužování aktivovaných MK, pomocí koenzymu A za spotřeby ATP probíhá na endoplazmatickém retikulu, kdy nezbytnými enzymy jsou elongázy typu ELOVL. Určitá mastná kyselina se prodlužuje vždy o dva atomy uhlíku. Postupnými reakcemi mohou vzniknout až kyseliny s velmi dlouhým řetězcem. Jejich tvorba je významná především v mozku, kde jsou tyto mastné kyseliny zabudovány do struktur lipidů. U savců bylo identifikováno sedm různých ELOVL enzymů (označených ELOVL1-7). [1, 4]

Vznik nenasyčených MK probíhá enzymaticky pomocí desaturáz. K vnesení dvojně vazby je také nutný molekulární kyslík, NADPH a cytochrom b₅. Lidské desaturázy mohou vytvořit

dvojnou vazbu jen na určitých pozicích. Například mezi uhlíkem 9 (C-9) a uhlíkem 10, kdy z kyseliny stearové vznikne kyselina olejová nebo z kyseliny palmitové vzniká kyselina palmitolejová. Další pozice, kde může vzniknout dvojná vazba je pozice C-4, C-5 a C-6. Z důvodu, že dehydrogenace na dvojnou vazbu není u člověka možná na pozici za C-9, člověk není schopen syntetizovat nenasycené MK s více dvojnými vazbami, jako jsou kyselina linolová, linolenová a arachidonová. Esenciální mastné kyseliny jsou proto kyselina ω -6 linolová a ω -3 linolenová. Kyselina arachidonová je ve své podstatě také esenciální, ale pouze pokud chybí ve stravě jedince i kyselina ω -6 linolová, protože z té už kyselina ω -6 arachidonová vzniknout může. Polynenasycené MK (PUFA) jsou důležitým prekurzorem signálních molekul a eikosanoidů. Kyselina linolová je prekurzorem pro ještě delší polynenasycené MK, které jsou součástí mozkové hmoty. Rostliny naopak mohou vytvářet dvojně vazby za devátým uhlíkem, proto jsou rostlinné ω -3 a ω -6 mastné kyseliny podstatnou součástí stravy. Jak živočichové, tak rostliny vytvářejí pomocí svých specifických desaturáz nenasycené MK obsahující vazby pouze v poloze *cis*. Nenasycené *trans*-mastné kyseliny vznikají při technické rafinaci potravinových tuků. Předpokládá se, že tyto *trans*-mastné kyseliny by mohly představovat určité zdravotní riziko pro kardiovaskulární systém. [1, 2]

1.1.4 Odbourávání mastných kyselin

Postup odbourávání jednotlivých mastných kyselin se částečně liší podle toho, zda se jedná o MK s krátkým, středním, dlouhým či velmi dlouhým řetězcem. Základním procesem je však proces β -oxidace, který probíhá v matrix mitochondriích. MK s krátkým a středně dlouhým řetězcem přecházejí pomocí monokarboxylátového transportéru do mitochondriální matrix a aktivují se na acyl-CoA. MK s dlouhým řetězcem se aktivují na vnější mitochondriální membráně a poté jsou pomocí karnitinového člunku přeneseny skrz vnitřní membránu do matrix. Karnitinový člunek v podstatě určuje rychlost odbourávání MK v mitochondriích. Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem a rozvětvené MK se nejprve metabolizují v peroxizomech a až následně v mitochondriích. [1, 5, 6]

Proces mitochondriální β -oxidace je sled postupných oxidativních reakcí, ve kterých jsou z aktivovaných mastných kyselin postupně odštěpovány dvouuhlíkaté štěpy. V průběhu reakce se vždy oxiduje skupina acylového zbytku na uhlíku C-3, tudíž na β uhlíku (proto se tento označuje jako β -oxidace). β -oxidace je katalyzována různými koenzymy, které se specializují na MK s určitou délkou řetězce. Proces u MK s delším řetězcem musím proběhnout několikrát

za sebou a vzniká tak vysoké množství energie. Prostorově a funkčně je proces β -oxidace těsně napojen na dýchací řetězec a citrátový cyklus. Systém β -oxidace neprobíhá v erytrocytech ani v mozku. [1, 5, 6]

Odbourávání nenasyčených mastných kyselin, které většinou obsahují *cis* dvojnou vazbu, probíhá jako u nasycených MK pomocí β -oxidace až do chvíle, kdy proces dojde k *cis* vazbě. Protože enoyl-CoA-hydratáza je schopná metabolizovat pouze substráty s *trans* vazbou, dojde pomocí isomerázy k přeměně *cis* na *trans* dvojnou vazbu. β -oxidace pak pokračuje dále. Když proces dojde k další *cis* vazbě, neproběhne už přeměna na *trans* vazbu pomocí isomerázy, ale redukuje se pomocí NADPH a proces opět pokračuje dále. [1, 5, 6]

Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků jsou odbourávány stejně jako nasycené MK, ale v posledním kroku β -oxidace namísto acetyl-CoA vznikne propionyl-CoA, který se dále mění v sukcinyl-CoA a pokračuje další metabolickou dráhou. [1, 5, 6]

Odbourávání rozvětvených a methylovaných MK, jako je kyselina fytanová, začíná α -oxidací v peroxizomech a následuje peroxizomální β -oxidace, kdy se střídavě tvoří acetyl-CoA a propionyl-CoA. Když je řetězec zkrácen na 8 uhlíků, je přenesen do mitochondriální matrix, kde dokončí odbourávání jako MK se středně dlouhým řetězcem. [1, 5, 6]

Některé MK se mohou vzácně odbourávat i tzv. ω -oxidací v endoplazmatickém retikulu pomocí systému cytochromu P450. V tomto případě dochází ke karboxylaci koncově methylové skupiny a vzniká dikarboxylová kyselina. Ta může být odbourána β -oxidací až do délky 6 až 8 uhlíků, kdy tyto kyseliny jsou už dostatečně polární, aby byly rozpustné ve vodě, a jsou odbourávány jinde nebo vylučovány močí. [1, 5, 6]

1.1.5 Peroxizomy a jejich funkce

Peroxizomy jsou membránové organely vyskytující se v cytoplazmě a jsou velikostně srovnatelné s lysozomy (0,2 - 0,5 μ m). Jsou přítomny ve všech buňkách a nejvíce jsou zastoupené v játrech, kde tvoří až 1 % objemu hepatocytu. Peroxizomy neobsahují DNA ani ribozomy, vznikají na endoplazmatickém retikulu a mají schopnost se dělit. [1]

Peroxizomy obsahují oxidázy, které mají schopnost oxidativně štěpit různé substráty, jako lipidové metabolity a některé aminokyseliny a zároveň redukovat kyslík na peroxid vodíku. Jednou z důležitých funkcí peroxizomů je postupné zkracování mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA), které obsahují ve svém řetězci více než 18 uhlíků

a štěpení methyl-rozvětvených mastných kyselin. V peroxizomech probíhá obdoba mitochondriální β -oxidace, která ale neslouží pro získávání energie. Zkrácení VLCFA probíhá v každém cyklu o jednu acetylovou jednotku, dokud není délka řetězce mastné kyseliny 4 až 6 uhlíků. Tyto krátké mastné kyseliny jsou dále přeneseny jako deriváty karnitinu pomocí tzv. karnitinového člunku spolu s odštěpenými acetylovými zbytky do mitochondrií. Methyl rozvětvené mastné kyseliny se nejprve zkracují systémem α -oxidace, kdy je jejich řetězec zkracován vždy pouze o jeden uhlík v každém cyklu. Následně jsou také zkracovány β -oxidací peroxizomů nebo produkty o délce cca 8 uhlíků jsou pak rovněž přenášeny do mitochondrií. [1, 7]

Další funkcí peroxizomů je rozklad etanolu na acetaldehyd díky působení peroxizomální katalázy. Při procesu zpracování alkoholu je peroxizomální cyklus likvidace pouze doplňkový, ale ne zcela zanedbatelný. Především se uplatňuje při výskytu vysokých koncentrací alkoholu. [1, 7]

Onemocnění, za kterými stojí poruchy činnosti peroxizomů, jsou vyvolány chybnými kroky v peroxizomálním metabolismu nebo nedostatečnými, případně nefunkčními enzymy peroxizomálního cyklu. Mezi tato onemocnění se řadí např. Zellwegerův syndrom, Refsumův syndrom nebo adrenoleukodystrofie. Zellwegerův syndrom je založen na všeobecném nedostatečném množství peroxizomů v organismu, které způsobuje poškození především jater a mozku. Refsumův syndrom je způsoben neschopností α -oxidace peroxizomů štěpit kyselinu fytanovou. Adrenoleukodystrofie je vyvolána nedostatečným množstvím ABC transporterů v peroxizomální membráně. U pacientů dochází k výraznému hromadění VLCFA v séru a následně celém těle. VLCFA, které se hromadí u pacientů s adrenoleukodystrofií, jsou částečně absorbovány ze stravy, ale většina je výsledkem endogenní syntézy prostřednictvím prodloužení mastných kyselin s dlouhým řetězcem. V důsledku zhoršené degradace VLCFA a nedostatečného importu VLCFA-CoA do peroxizomů je syntéza VLCFA u adrenoleukodystrofie zesílena. [1, 2, 4]

1.1.6 MK jako součást lipidů a vyšších struktur

Mastné kyseliny představují základní složku lipidů a dalších vyšších buněčných struktur. Jednoduché lipidy jsou estery tvořené určitými mastnými kyselinami a alkoholy. Podle typu navázaných látek rozlišujeme několik lipidových tříd, např.: estery cholesterolu, diacylglyceroly nebo triacylglyceroly. [1, 2]

Estery cholesterolu (ECH) slouží jako zásoba a přepravní jednotka cholesterolu v těle. V transportních ECH je v nevyšší koncentraci přítomná kyselina linolová, dále olejová a palmitová. V intracelulárních ECH pak kyselina olejová a palmitoolejová. Estery cholesterolu se tvoří intravaskulárně za katalýzy enzymem lecitin:cholesterol acyl transferázy (LCAT). Jádra lipoproteinů, kterými jsou převážně LDL a HDL lipoproteiny, jsou z podstatné části tvořena právě estery cholesterolu. Při ateroskleróze také tvoří hlavní část lipidových inkluzí makrofágů v aterosklerotických plátech. [2, 3]

V triacylglycerolech (TG) představují mastné kyseliny významný zdroj energie. TG jsou hlavní složkou tukové tkáně neboli adipocytů. Tvoří také základní část jádra chylomikronů a VLDL lipoproteinů. Diacylglyceroly (DG) představují určité mezistupně syntézy nebo degradace různých lipidů, případně slouží jako tzv. druzí poslové při některých reakcích metabolismu. Za fyziologických podmínek je jejich koncentrace v plazmě nízká. [2, 3]

Malé množství mastných kyselin, které nejsou esterifikovány, se označují jako volné mastné kyseliny (VM). Volné mastné kyseliny jsou produkty lipolýzy a představují zdroj pro syntézu dalších lipidů systémem enzymatických reakcí pomocí elongáz či desaturáz. V plazmě jsou za fyziologických podmínek v nízké koncentraci a jsou vázané na albumin. [2, 3]

Mastné kyseliny jsou také nepostradatelnou složkou fosfolipidů (PL), které tvoří veškeré membrány v buňkách. Díky amfifilnímu charakteru mastných kyselin tvoří fluidní dvojvrstvu. Propustnost a pevnost membrány ovlivňuje přítomnost nasycených a nenasycených mastných kyselin. Zastoupení určitých mastných kyselin v buněčných membránách je druhové i tkáňové specifické. [2, 3]

1.2 Adrenoleukodystrofie

Adrenoleukodystrofie (ALD) je nejčastější dědičná peroxizomální porucha. Frekvence výskytu je celosvětově cca 1:16 000 jedinců. Toto onemocnění je charakterizováno jako na chromozomu X vázaná porucha lipidového metabolismu, která se projevuje insuficiencí nadledvin a neurologickými symptomy. Mutací v genu ABCD1 dochází k ovlivnění ABCD1 transmembránového receptoru, dříve označovaného jako ALDP protein (peroxizomální transmembránový protein), který zapříčiňuje poruchu v peroxizomální β -oxidaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA). Následně dochází ke kumulaci VLCFA v plazmě a tkáních. [4, 8, 9, 10, 11, 12]

1.2.1 Genetický aspekt

Adrenoleukodystrofie je monogenetické metabolické onemocnění, které je způsobeno různými mutacemi v genu ABCD1, jenž se vyskytuje na chromozomu Xq28. Od umístění na chromozomu X se odvíjí i dědičnost této choroby. U mužů, protože mají jen jeden X chromozom, stačí jedna změněná alela genu ABCD1 a onemocnění se vždy v určité míře projeví. Muži s tímto onemocněním mají 100% pravděpodobnost, že předávají mutovaný chromozom X svým dcerám, zato všichni synové tento chromozom nezdědí. Naopak ženy mají chromozom X ve dvou kopiích, a tudíž jedna změněná alela genu ABCD1 většinou nezpůsobí závažné příznaky X-vázané adrenoleukodystrofie, jako u mužů. Pokud se projeví, tak ale v pozdějším věku než u mužů a s mírnější manifestací. Ženy s tímto onemocněním mají 50% pravděpodobnost, že předávají mutovaný chromozom X všem svým dětem bez ohledu na pohlaví. Kdyby se u ženy vyskytly dvě změněné alely genu ABCD1, vyskytovaly by se u ní stejné rysy adrenoleukodystrofie jako u mužů s jednou mutovanou alelou. Tento případ je ale extrémně vzácný. [4, 8, 9, 11]

Gen ABCD1 kóduje ALDP protein, který se podílí na transportu mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem do peroxizomů. ABCD1 gen má délku cca 20 kb a obsahuje 10 exonů, které jsou transkribovány do tří splice variant. Základní varianta mRNA obsahuje 3669 bp a výsledný protein ALDP je složen z 745 aminokyselin. Druhá varianta obsahuje 1016 bp a výsledný protein se skládá z 227 aminokyselin. Třetí splice varianta je složená z 668 bp, výsledný protein ale nevzniká. Účel a funkce tohoto alternativního sestříhu genu zatím nebyl definován. Mutace v genu ABCD1 způsobují nedostatek ALDP, proto je narušen transport a odbourávání VLCFA, čímž dochází k zvýšení koncentrace těchto mastných kyselin v plazmě pacientů.

Dochází rovněž k jejich hromadění ve všech tělních orgánech. Nahromaděné VLCFA toxicky působí především na kůru nadledvinek a nervovou soustavu. Toto toxické působení je způsobeno akumulací VLCFA, které organismus neumí odbourávat a dochází tak k utlačování buněčných struktur a narušování jejich fyziologických procesů. Dochází k destabilizaci struktury a funkčnosti buněčných membrán. V kůře nadledvin způsobují adrenokortikorenální insuficienci, a tím i nedostatek některých hormonů. V mozku a míše dochází působením VLCFA až k rozpadu myelinu, a tudíž k poruše vedení nervových vzruchů. [4, 8, 9, 11, 13, 14]

ALD je onemocnění bez zobecněné korelace genotyp-fenotyp z důvodu, že stejná mutace v genu ABCD1 může vést k různým fenotypovým projevům v rámci jednoho rodu. Mutaci může vzniknout celá řada, nejběžnější je však delece dvou párů bazí v exonu 5, která byla nalezena u pacientů s celým klinickým aspektem X-ALD. [4, 9, 10, 11, 12]

1.2.2 Klinické spektrum a formy ALD

X-vázaná adrenoleukodystrofie je onemocnění s významnou heterogenitou v klinických projevech. Při narození jsou pacienti s X-ALD asymptomatictí. Téměř u všech postižených mužů se během života projeví adrenokortikální insuficience, asi u 80 % před dosažením dospělosti. V dospělosti se rozvíjí chronická myelopatie, která se začíná projevovat okolo třicátého roku života. Cerebrální ALD se může rozvinout v jakémkoli věku, nejmladšímu pacientovi byly cca tři roky. U postižených žen se adrenokortikální insuficience a cerebrální ALD rozvine jen vzácně, ale u více než 80 % žen se po šedesátém roce objevují příznaky myelopatie. Zatím nebyl identifikován přesný vnější spouštěč (infekce, traumata), který by inicioval nástup cerebrální ALD. [4, 8, 9, 11, 12]

Rozlišujeme několik odlišných typů adrenoleukodystrofie, a to podle fenotypových projevů u postižených mužů a žen, a také podle věku pacienta při nástupu symptomů. U mužů dělíme fenotypový projev na dětskou cerebrální formu; dospívající cerebrální; adrenomyeloneuropatii (AMN); dospělou cerebrální formu; forma pouze nadledvinové insuficience (=pouze Addison) a typ asymptomatický. Formy vyskytující se u žen jsou: asymptomatická; adrenomyeloneuropatie mírná, střední a těžká; forma s postižením mozku. [4, 8, 9, 12]

Dětská cerebrální forma se typicky projevuje u chlapců, u dívek jen zřídka. Postižení chlapci začínají mít problémy s učením a chováním, které obvykle začínají mezi 4. až 10. rokem života. Časem se mohou příznaky zhoršovat. Pacienti mohou mít potíže se čtením, psaním

a porozuměním řeči či textu. Mezi další příznaky patří agresivní chování, problémy se zrakem, sluchem, potíže s polykáním, špatná koordinace a zhoršená funkce nadledvin. Rychlost, s jakou tato porucha postupuje, je variabilní, ale může být rychle progredující, což většinou vede k úplné invaliditě a smrti do 4 let od diagnózy. [4, 8, 9, 12]

Adolescentní cerebrální forma se začíná projevovat v období 11 až 21 let. Klinický obraz a patologie je v podstatě stejná jako u dětské formy s poněkud pomalejší progresí. [8, 9, 12]

Adrenomyeloneuropatie se začíná projevovat od ranné dospělosti až do středního věku. U postižených jedinců se vyvíjí progresivní ztuhlost, slabost nohou a spastická bolest. Objevují se poruchy střev, močových cest, pohlavních cest a často se mění i jejich chování a intelekt. Patologie zahrnuje pomalou progresivní distální axonopatii a atrofií míchy a periferní neuropatii. U většiny pacientů se také vyskytuje adrenokortikální insuficience a u určitého procenta těžce postižených progreduje AMN až do formy dospělé cerebrální X-vázané adrenoleukodystrofie. Tato progresse nastává obvykle mezi třicátým a čtyřicátým rokem. U postižených žen s jednou mutovanou alelou je toto stádium nejobvyklejší. Má však značně pomalejší progresi než u mužů, a to v průměru o 30 let. [4, 8, 9, 12]

Dospělá cerebrální forma nastává u části pacientů s AMN. U postižených mužů okolo čtyřicátého roku života, u žen v průměru okolo šedesátého pátého roku. U žen je tento typ velmi vzácný. Bylo hlášeno jen několik takových případů. Projevuje se demencí, poruchami chování a neurologickými defekty podobnými jako u dětské cerebrální formy. Rychlost progresse symptomů může být velmi variabilní s nepříznivou prognózou. [4, 8, 9, 10, 12]

Forma pouze nadledvinové insuficience (=pouze Addison) je klasifikována u pacientů s X-vázanou adrenoleukodystrofií, přičemž jediným jejich příznakem je adenokortikální insuficience. Tato nedostatečnost se může objevit kdykoliv od narození do dospělosti. Forma pouze Addison se může u pacienta držet poměrně dlouhou dobu, nebo se může překloupat v typ AMN, nebo až v cerebrální formu onemocnění. [8, 9, 10, 12]

Asymptomatický typ adrenoleukodystrofie je u pacientů, kteří vykazují určité biochemické a genetické abnormality, ale nemají žádné klinické příznaky tohoto onemocnění. Tato forma je běžná v dětství, kdy během deseti let se u poloviny pacientů začnou projevovat příznaky nadledvinové insuficience nebo AMN. [4, 8, 9, 11, 12]

1.2.3 Patogeneze a patofyziologie

Základním biochemickým defektem je akumulace VLCFA neboli nasycené, nerozvětvené mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, které jsou v peroxizomech postupnými enzymatickými reakcemi β oxidačního řetězce degradovány. Akumulace VLCFA v plazmě a tkáních, zejména C26:0, C24:0 a C22:0, je způsobena poruchou peroxizomálního transmembránového proteinu, který se podílí na transportu ve formě VLCFA-CoA do peroxizomu. Většina mutací má za následek nestabilní ALDP, jenž způsobí sníženou degradaci, a tím zvýšenou akumulaci esterů VLCFA-CoA v cytosolu, které jsou substrátem pro jejich další elongační systém uhlíkatého řetězce, umožněný enzymem ELOVL1. Což má za následek další zvýšení koncentrace VLCFA ve tkáních, viz. Obrázek 2. [4, 9, 10, 12]

Zatím neexistuje komplexní model pro studium průběhu patogeneze X-ALD. ABCD1 transkripty jsou exprimovány v různých tkáních. Nejvíce v tukové tkáni, tenkém střevě, varlatech a kůře nadledvin, ale nejsou detekovatelné ve dřeni nadledvin. Je zajímavé, že ABCD1 je poměrně slabě exprimován v CNS v porovnání s jinými tkáněmi. Při ALD jsou zvýšené hladiny VLCFA ve všech tkáních, ale buňky kůry nadledvin, varlat, centrální nervové soustavy (CNS) a periferních nervů jsou nejvíce senzitivní k dysfunkci ALDP. Proč tomu tak je, zatím není zcela objasněno. [4, 10, 12, 14]

Experimenty *in vitro* ukazují, že vysoce hydrofobní VLCFA jsou toxické pro buňky kůry nadledvin, oligodendrocyty a astrocyty. Expozice adrenokortikálních buněk C26:0 snižuje odpověď na stimulaci adrenokortikotropním hormonem (ACTH), a tím i sníženou produkci glukokortikoidů. V poslední době se výzkum soustředí na indukci oxidačního stresu způsobeného VLCFA, který je příčinou poškození a smrti buněk u X-ALD. Oxidační stres působí negativně na mitochondrie a vyvolává apoptózu buněk. Ve studii Eichler [13] zjistili, že cytotoxicita je závislá na délce mastného acylového řetězce. Výsledky naznačují, že mikroglialní apoptóza je způsobena toxickými hladinami VLCFA obsahující lysofosfatidylcholin (PC). Toto toxické působení může představovat časnou patogenní změnu v cerebrální X-ALD. Data naznačují, že oxidační stres indukovaný VLCFA nebo snížení antioxidantní obrany v oligodendrocytech produkující myelin, by mohlo být hlavním faktorem, který iniciuje axonální poškození u X-ALD. Byly také popsány účinky na acylaci proteinů. Například hydrofobní myelinový proteolipidový protein (PLP) obsahuje kovalentně vázané mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, hlavně C16:0, C16:1, C18:0 a C18:1. U X-ALD dochází ke zvýšení množství VLCFA vázaného na tento protein. [9, 10, 11, 12, 16, 17]

Další výzkum přesných patofyziologických mechanismů X-ALD je značně ztížen chybějícím vhodným zvířecím modelem, který by vhodně simuloval toto onemocnění. Vzhledem k tomu, že u X-ALD není korelace mezi genotypem a fenotypem, musí být do průběhu patogeneze zapojeny i další faktory, jako epigenetické a enviromentální, které ještě nebyly zcela identifikovány. Výzkumy naznačují, že geny zapojené do syntézy VLCFA jsou potencionálními modifikačními geny. Mechanismus, jak VLCFA interagují s dalšími faktory, které způsobují zánět, není zatím zcela jasný. [9, 11]

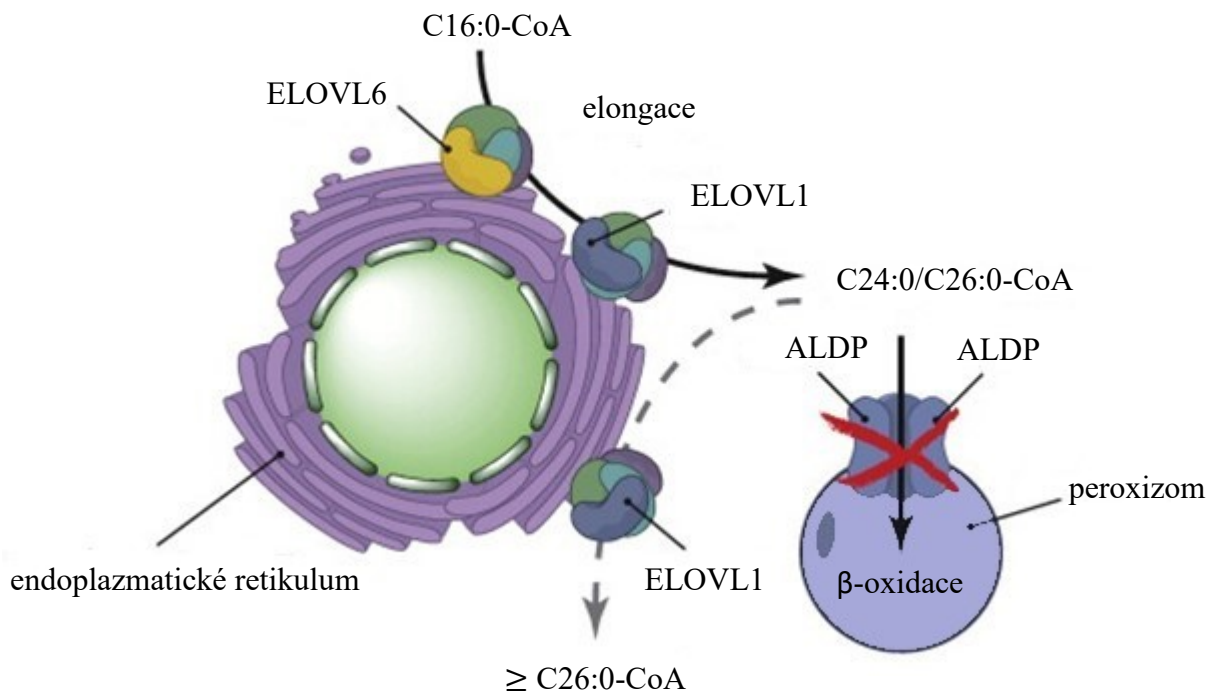
Kromě ABCD1 transportéru jsou v peroxizomální membráně lokalizované další dva transportéry, a to ABCD2 a ABCD3, které mají překrývající se specifitu pro nasycené a mononenasyčené mastné kyseliny. Nedávné studie dokázaly, že ABCD2 a ABCD3 transportéry dokážou částečně přebrat a korigovat funkci ABCD1, ale jsou však méně účinné a nedokáží kompenzovat poruchu ABCD1. ABCD3 se také účastní transportu meziproductů žlučových kyselin a mastných kyselin s rozvětveným řetězcem. [10, 12, 18]

Je zajímavé, že mozek a nadledvinky, které mají nejvyšší obsah cholesterolu v těle, jsou nejvíce postižené nedostatkem ABCD1. Byly provedeny některé výzkumy, které zkoumají zapojení metabolismu cholesterolu do ALD. Získaná data poukazují na možnost, že dysfunkce transportu cholesterolu může hrát patogenní roli v oxidativních a zánětlivých procesech. [12, 15]

Cholesterol vázaný na lipoproteiny z krevního oběhu nemůže překročit hematoencefalickou bariéru, a tudíž většina mozkového cholesterolu je syntetizována přímo v mozku. 70 % je uloženo v myelinu jako volný cholesterol, který má poločas rozpadu cca 5 let, zbytek je uložen v plazmatických membránách neuronů a gliových buňkách, které jsou schopny odbourat cholesterol za dobu cca 5 měsíců. Přebytek cholesterolu v neuronech a dalších buňkách je uložen jako estery cholesterolu, takže cca 1 % mozkového cholesterolu v normálním dospělém mozku tvoří estery cholesterolu v lipidových kapénkách. Lipidové kapénky se tvoří kvůli zvýšené expresi genu pro acyl-CoA cholesterol acyltransferázu 1 (ACAT1) jako reakce na vysoké hladiny cholesterolu. Neurotoxická činidla a oxidační stres zvyšují aktivitu ACAT1, která je více exprimována v neuronech než v gliových buňkách. [10, 12, 15]

Při posmrtném vyšetření mozku se velké oblasti demyelinizace a ztráty axonů vyskytují především ve spleniu *corpus callosum* a parietookcipitální bílé hmotě. Postižení frontální bílé hmoty je variabilní. Často se vyskytuje obecná atrofie mozku a míchy se ztrátou především bílé hmoty. Zvýšená intracelulární koncentrace esterů VLCFA-CoA podporuje inkorporaci VLCFA

do různých komplexů lipidů, ve kterých se za fyziologických podmínek nevyskytují. Substrátová specifita různých enzymů metabolizujících lipidy určuje množství zabudovaných VLCFA. Složením a obsahem těchto enzymů se jednotlivé buňky liší, a tím dochází k rozdílné distribuci VLCFA. To vede k zásadní regionální variabilitě, která je dobře viditelná na bílé a šedé mozkové hmotě. Při pitvním zkoumání mozku normálně vypadající bílé hmoty u postiženého cerebrální ALD, byl v bílé hmotě ve fosfatidylcholinové frakci nalezen 39x vyšší nadbytek C26:0. V této lipidové frakci byl také nalezen nadbytek C30:0, C32:0 a C34:0. Naopak ve frakci fosfolipidů, esterů cholesterolu a v triacylglycerolech byly hladiny C26:0 normální nebo jen 2x zvýšené. Lipidový profil se mění, když se zkoumají aktivní demyelinizační oblasti bílé hmoty. V této oblasti jsou VLCFA ve vysoké koncentraci ve frakci esterů cholesterolu a je snižena hladina volného cholesterolu. Makrofágy/mikroglie s deficitem ABCD1 nejsou schopny degradovat tyto estery cholesterolu, které se následně ukládají a vytváří až jehličkovité krystalické útvary. Zvýšená aktivita ACAT1 v reakci na zánět a oxidační stres také vede ke zvýšení koncentrace esterů cholesterolu s VLCFA. Dále bylo zjištěno, že obsah VLCFA v lyso-fosfatidylcholinu indukuje apoptózu mikroglíí a nábor makrofágů z periferie, které se aktivně účastní demyelinizačního zánětlivého procesu po narušení hematoencefalické bariéry. [10, 11, 12]



Obrázek 2: Elongace MK a porucha metabolismu VLCFA [11]

1.2.4 Diagnostika

Jako diagnostický marker k identifikaci nástupu ALD v současné době slouží magnetická rezonance mozku, která se zaměřuje na zobrazení lézí v bílé mozkové hmotě, a biochemické stanovení koncentrací VLCFA v séru pacienta. Studie, která spojila histopatologickou a biochemickou analýzu mozku, prokázala, že VLCFA se akumulují v morfologicky normálním mozku. Toto zjištění tedy ukazuje, že abnormální biochemické hodnoty koncentrací VLCFA předchází morfologickým změnám mozkové tkáně. [4, 9, 10, 11]

Z molekulárně biologických metod je možné diagnostikovat ALD pomocí sekvenace genu pro ABCD1. Dále také pomocí metody kvantitativní real-time polymerázové řetězové reakce (q-PCR) nebo v případě delecí metodou fluorescenční in-situ hybridizace (FISH). Při sekvenční analýze ABCD1 genu je podstatný specifický výběr primeru, protože určité pseudogeny vykazují výraznou nukleotidovou identitu s genem ABCD1. V důsledku tohoto překryvu by mohlo dojít k přehlédnutí mutace a špatné diagnostice. Tyto metody jsou však schopny stanovit přítomnost mutací. Nenesou ale žádnou prediktivní hodnotu v tom, jak se bude onemocnění vyvíjet v průběhu času, a to také z důvodu, že mutace v tomto genu mohou být velmi rozmanité. Zatím bylo zjištěno a v databázi uvedeno cca 900 různých možných mutací způsobující ALD. [4, 12, 16]

Protože akumulace VLCFA je primární biochemickou abnormalitou u ALD, je určení koncentrace VLCFA a jejich poměrů v séru pacientů základní biochemický biomarker. Metodou plynové chromatografie se stanovují především nasycené mastné kyseliny C26:0, C24:0 a C22:0. Pro zlepšení citlivosti a zvýraznění cut/off hodnot se doporučuje upravit koncentrace těchto mastných kyselin do vzájemných poměrů, a to C24:0/C22:0 (<1,0) a C26:0/C22 (<0,02). [11, 12, 15]

V současné době zatím nejsou k dispozici stoprocentní molekulární markery pro kvantifikaci závažnosti onemocnění, kvůli absenci korelace genotyp-fenotyp. V databázi mutací při ALD bylo popsáno více než 900 různých možných mutací způsobující ALD. Chybí citlivé biomarkery pro monitorování a biomarkery pro predikci progresu onemocnění a hodnocení účinnosti terapie. Určitá studie se snažila najít rozdíly mezi hladinami nasycených a mono-nenasycených mastných kyselin u pacientů v různých stádiích onemocnění ALD. Byly nalezeny vyšší hladiny nasycených mastných kyselin C26:0 až C30:0 u pacientů s cerebrální ALD, ale u pacientů s AMN byly sniženy. Kromě toho byly hladiny mono-nenasycených

mastných kyselin C22:1, C24:1, C25:1 sníženy u pacientů s mozkovou ALD, ale ne u pacientů s myelopatií. [4, 11, 12]

VLCFA jsou začleňovány do různých lipidů včetně gangliosidů, fosfatidylcholinů a esterů cholesterolu. Fosfatidylcholinu mohou být převedeny na lysoPC enzymem fosfolipáza A2 (PLA2) nebo na lecitin-cholesterol acyltransferázy (LCAT). VLCFA obsahující C26:0-lysoPC představují slibný biochemický marker, který převyšuje stanovení samotných VLCFA v plazmě pacientů, protože nedávná studie prokázala, že ženy s ALD s normálními hodnotami koncentrací VLCFA mají zvýšené hladiny C26:0-lysoPC v suchých krevních skvrnách a v plazmě. Tento marker je také využíván i při novorozeneckém screeningu. Další studie uvádějí, že u pacientů s cerebrální ALD pozorovaly snížené hladiny více-nenasycených mastných kyselin jako C20:3-lysoPC a C20:4-lysoPC v séru oproti pacientům s neurologicky asymptomatickými formami ALD. Kromě toho byly hladiny těchto lipidů ještě nižší v séru pacientů s mozkovou ALD přibližně jeden rok před prvními změnami na mozkovém MRI. Tyto výsledky by mohly naznačovat, že hladina více-nenasycených mastných kyselin může korelovat s postupem rozvoje neurozánětu. [4, 11, 12, 16]

Jeden z přístupů, jak identifikovat nové biomarkery, je lipidomika. Lipidomickou analýzou fibroblastů pacientů s ALD v cerebrálním stádiu a pacientů s myelopatií byly zjištěny nižší hladiny TG a ceramidu ve skupině s cerebrální ALD oproti skupině s myelopatií. TG vykazují neuroprotektivní účinky proti lipidotoxicitě indukované mastnými kyselinami a brání indukci nekroptózy v oligodendrocytech a astrocytech. Dále se studie zaměřila na glykosfingolipidy, kdy pouze hexosylceramid 44:1 vykazoval významný rozdíl mezi cerebrální ALD a myelopatií. [11, 12]

Také se uvažuje o markerech oxidačního stresu jako o další možnosti biomarkerů pro ALD, např. stanovení aktivity antioxidantního enzymu superoxiddismutázy (SOD), která poskytuje buněčnou ochranu proti reaktivním formám kyslíku, a polymorfismy SOD mohou být spojeny s cerebrálním fenotypem ALD. Také stanovení koncentrací glutathionu vykazovalo určité výsledky. Další studie se zaměřily na stanovení hladin určitých prozánětlivých cytokinů, které mohou být spojovány se zánětlivou demyelinizací. Jako vhodný prognostický biomarker k predikci výsledku po léčbě se ukazuje i celková hladina bílkovin, která silně koreluje se skórem závažnosti na MRI před transplantací hematopoetických kmenových buněk (HCT) a po transplantaci. Také chitotriosidáza představuje slibný marker pro monitorování výsledku léčby pacientů s ALD. [10, 11, 12]

Zajímavý biomarker, který by mohl mít také využití v diagnostice ALD, je lehký neurofilamentní řetězec (NfL). Neurofilamenta jsou součástí cytoskeletu nervových buněk, hojně se vyskytují v axonech. Jedná se o neuron-specifické vláknité bílkoviny složené z lehkých, středně těžkých a těžkých řetězců. Při poškození axonů jsou vyplavovány do mozkomíšního moku (CSF) přes hematoencefalickou bariéru nebo se dostávají do krevního oběhu venózní drenáží. Jejich zvýšená hladina odráží poškození axonů různé etiologie a byla zjištěna u cévních mozkových příhod, demencí, roztroušené sklerózy (RS) a dalších neurologických onemocnění. Ze studií vyplývá, že se tyto struktury jeví jako vhodné časné markery poškození axonů a několik studií potvrdilo korelaci sérových a likvorových hladin NfL. [11, 15, 19]

Také podrobné výzkumy CD1 genového shluku identifikovaly jeden jednonukleotidový polymorfismus (SNP), který byl identifikován v promotorové oblasti ELOVL1. Funkční účinek tohoto SNP je předmětem dalšího výzkumu. Je možné, že tento lokus není jediný modifikační, který by umožňoval predikci budoucího fenotypového výsledku u presymptomatických pacientů s X-ALD. V současnosti dostupná data poukazují na existenci mnoha vzácných interakcí genetických variant, které ovlivňují klinické projevy u pacientů s X-ALD. [4, 20]

1.2.5 Prenatální diagnostika a novorozenecký screening

Pro ženy ve fertilním věku, s potvrzenou přítomností mutace v ABCD1 genu, je prenatální diagnostika velmi užitečná. Zvláště, když je očekávaný plod mužského pohlaví. Molekulárně biologickou analýzu ABCD1 genu lze provést z čerstvého vzorku choriových klků, které je možné odebrat v 11.–13. týdnu těhotenství. Prenatální diagnostiku lze také provést na amniových buňkách, které se odebírají v 15.–18. týdnu těhotenství. Tento přístup však vyžaduje alespoň další 2–3 týdny kultivace amniotických buněk, aby se vytvořil dostatek buněčného materiálu pro molekulární analýzu. V určitých případech lze v některých zemích provést i preimplantační genetickou diagnostiku. K tomuto kroku se přistupuje poté, co heterozygotní žena měla alespoň dvakrát prenatální diagnostikou potvrzenou přítomnost mutaci v ABCD1 genu plodu, který vedl k přerušení těhotenství z důvodu ALD. [16]

ALD je většinou diagnostikována až po narození, ale prenatální diagnostika má výhodu zjištění přítomnosti onemocnění ještě před narozením. Jako jeden z markerů se používá C26:0-lysoPC, který vyplývá z metabolismu lyso-fosfatidylcholinu se zabudovanými VLCFA. Stanovuje se pomocí bodové kapalinové chromatografie s propojením tandemové hmotnostní

spektroskopie (LC-MS/MS). Tento metabolit se nyní používá v prenatální diagnostice a novorozeneckém screeningu v Kennedy Krieger Laboratory and Mayo Clinic. V říjnu 2019 plánovalo Nizozemsko zahájit pilotní screening ALD u všech novorozenců mužů. Zatím byl úspěšně vyvinut celoplošně použitelný algoritmus screeningu novorozenců s ohledem na různé etické otázky různých zemí. [4, 10, 11, 12, 16, 21]

Diagnostické markery ALD by bylo třeba důkladněji prozkoumat na vyšším množství pacientů. To je však obtížné z důvodu pomalé progresy myelopatie u ALD, a tedy potíží se získáváním opakovaných vzorků v dostatečně dlouhé době, aby bylo možné detekovat významné změny v hladinách těchto biomarkerů. [10, 11, 12, 16]

1.2.6 Terapie

V současnosti nejsou k dispozici žádná klinicky účinná terapeutika, která by dokázala účinně snížit koncentrace VLCFA v těle. ELOVL1 je specifický enzym pro VLCFA a jeho inhibicí by se teoreticky mohlo dosáhnout zamezení prodlužování řetězců VLCFA. Bezafibrát snižuje akumulaci VLCFA ve fibroblastech X-ALD inhibicí ELOVL1. Ačkoli v klinické studii bezafibrát nebyl schopen snížit hladiny VLCFA v plazmě nebo lymfocytech u pacientů s X-ALD, inhibice ELOVL1 představuje atraktivní možnost terapie. Neúčinnost bezafibrátu byla pravděpodobně způsobena neschopností dosáhnout adekvátní hladiny léčiva in vivo. Také biologická léčba pomocí protilátek by mohla ovlivnit průběh onemocnění navázáním protilátky na ALDP. [9, 12, 16, 22]

Transplantace hematopoetických kmenových buněk je život zachraňující zlatý standard, který může zastavit zánět v časných stádiích. Může také poskytnout účinnou léčbu mozkové formy ALD, protože akutní zánět je pozorován pouze v CNS, a nikoliv v jiných tkáních pacientů s X-ALD. Transplantovat se mohou alogenní buňky i autologní kmenové buňky po genové úpravě ex vivo. [9, 10, 11, 12, 16]

Po alogenní transplantaci (HCT) v časném stádiu, kdy je dobrý klinický stav pacienta a na MRI se vyskytuje málo lézí, cerebrální ALD zastavuje progresi onemocnění. Prognóza v této skupině je velmi dobrá s úmrtností nižší než 5 %. Pokud je ALD v pokročilejším stádiu, je prognóza nepříznivá i po transplantaci. Transplantace kostní dřeně je úspěšná jak u dětské, tak dospělé cerebrální formy, ale u dospělých už nemá takový klinický výsledek vzhledem k již existujícím symptomům AMN jako je motorické postižení a inkontinence. [9, 10, 11, 12, 16]

U chronické myelopatie neexistuje žádná léčba, která by zabránila vzniku a zpomalila progresi onemocnění. V malé otevřené studii dospělých pacientů s AMN však bylo prokázáno, že kombinace vícekrát podaných vysokých dávek antioxidantů normalizuje biomarkery oxidačního poškození a zánětu. Jinak je léčba pouze symptomatická s podporou rehabilitačního cvičení. Není známo, jestli by progresi myelopatie u X-ALD po transplantaci HCT byla pomalejší. [9, 12]

Léčba adrenokortikální insuficience u X-ALD je stejná jako léčba pacientů s autoimunitní Addisonovou chorobou, a to hormonální substituční terapií. [9, 10, 12]

Při zkoušení dietních omezení příjmu VLCFA, u pacientů s ALD, nevedla dieta ke snížení plazmatické koncentrace C26:0, protože valná většina mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem je endogenního původu. Jeden čas byl zkoušen Lorenzův olej, který obsahoval směs 4:1 triacylglyceridů kyseliny olejové a erukové, ale výsledky terapie nebyly úspěšné. Další strategie, jako například podávání protizánětlivých léků, také nebyly úspěšné. Jako u většiny léčby neurologických onemocnění je zásadní problém farmakodynamika hematoencefalické bariéry. [4, 10, 12]

Metody genové terapie by mohly být potencionálním východiskem k léčbě X-vázané adrenoleukodystrofie. Předběžné výsledky studie u chlapců s ALD s raným stádiem cerebrální formy, kteří byli léčeni autologní HSCT s ex vivo korekcí lentivirového genu CD34 pozitivních kmenových buněk, nebylo pozorováno žádné úmrtí na léčbu nebo reakce štěpu proti hostiteli. Všichni zůstali bez funkčních poruch během jednoho roku sledování. K potvrzení účinnosti a bezpečnosti genové terapie ABCD1 lentivirovým vektorem Lenti-D je zapotřebí delší sledování a větší množství vzorků. Kromě ex vivo korekce lentivirového genu se sleduje in vivo genová terapie, založená na adeno-asociovaném viru 9 (AAV9). [10, 12, 21]

1.3 Analýza vzorků mastných kyselin

K analýze složení MK v biologických vzorcích se nejčastěji využívá metoda plynové chromatografie (GC), jejímž výsledkem je chromatogram. Přípravy vzorků pro analýzu MK jsou různé. Obvykle se však používá dvou kroková metoda, která zahrnuje extrakci lipidů organickým rozpouštědlem a následnou derivatizaci MK, většinou na methylestery (FAME). Extrakce lipidů se obvykle provádí systémem dvou nemísitelných kapalin, kdy lipidy přecházejí do organické fáze (chloroform, toluen, atd.) díky jejich vyšší rozpustnosti v organických rozpouštědlech. Derivatizací na methylestery mastné kyseliny zvýší svou těkavost a je možné je analyzovat pomocí GC. Další možností přípravy je přímá methylace mastných kyselin bez extrakce lipidů, která se nyní zdá být účinnější a ekonomičtější metodou ke klasické organické extrakci. [23, 24, 25, 26]

1.4 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je poměrně jednoduchá a levná analytická metoda, která nevyžaduje náročné vybavení laboratoře a poměrně snadno se vyhodnocuje. Metoda separace jednotlivých látek ze směsného vzorku je založená na rozdílné afinitě ke dvěma nemísitelným fázím. Stacionární fází představuje pevný sorbent, většinou silikagel, imobilizovaný na pevný nosič, kterým bývá skleněná nebo hliníková deska. Nejčastěji se používá chemicky modifikovaný silikagel s malou a přesně definovanou velikostí částic. Tyto pevné fáze nacházejí uplatnění v tzv. vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografii (HPTLC), kdy jejich vysoká homogenita zajišťuje vyšší účinnost separace. Mobilní fází tvoří obvykle směs různých rozpouštědel. Pro separaci lipidů je vhodná například směs n-hexan, diethylether a kyselina octová. Výhodou metody HPTLC je, že mobilní fáze je dodávána na desku pomocí mikročerpadel, která zajišťují rovnoměrný tok eluentu tenkou vrstvou. Tloušťka sorbentu na pevné fázi a obsah mobilní fáze závisí na druhu stanovovaných analytů. [27, 28, 29, 30]

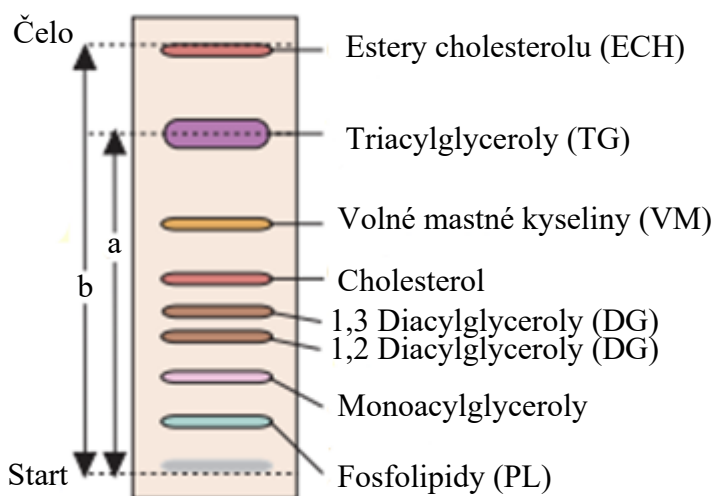
Analýza probíhá tak, že směsný vzorek se nanese ve formě kapky nebo tenké linky na vyznačený start chromatografické desky. Deska se poté přemístí do chromatografické vany s předem připravenou mobilní fází, kde dochází k nasycení celého objemu vany parami rozpouštědel. Spodní okraj desky je smáčen mobilní fází, která začne vzlínat a unášet určité složky naneseného vzorku směrem k čelu chromatografické desky. Podle afinity analytů k mobilní či stacionární fází se vzorek rozděluje na jednotlivé frakce. Rozdělené složky vzorku putují na desce v podobě skvrn, viz. Obrázek 3. Pokud jsou separované látky za normálních podmínek neviditelné, je nutné je dále vizualizovat použitím vhodného reakčního činidla,

většinou rozprášeného na chromatografickou desku s analyty. Jedním z příkladů vizualizace je použití 2,7-dichlorfluoresceinu a UV lampy. [27, 28, 29, 30]

Separované analyty charakterizuje jejich retardační faktor (R_F). R_F je bezrozměrná veličina, nabývající hodnot 0 až 1. Hodnota R_F definuje poměr mezi vzdáleností středu skvrny analytu od startu a celkové vzdálenosti startu a čela mobilní fáze. Z hodnoty R_F tedy vyplývá, že čím je analyt definován vyšším R_F , tím vyšší má afinitu k mobilní fázi a vyskytuje ve větší vzdálenosti od startu než analyt s nižší hodnotou R_F . [27, 29]

Pro kvantitativní analýzu separovaných analytů lze využít přímé detekce jednotlivých skvrn použitím skenovacích denzitometrů nebo nepřímou metodou, kdy je určitá frakce vyškrábána z desky, eluována vhodnými rozpouštědly a koncentrace analytu stanovena jinou analytickou metodou. [29, 31, 32]

$$R_F = \frac{a}{b}$$



Obrázek 3: TLC jednotlivých lipidových frakcí [1]

1.5 Derivatizace

Derivatizace zahrnuje specifické chemické reakce, kterými separované látky získávají nové vlastnosti. Díky těmto získaným vlastnostem je možné látku snáze identifikovat a stanovit. Někdy se provádí derivatizace proto, aby vůbec mohla být určitá látka separována. Různé metody chromatografie požadují různé vlastnosti separovaných látek, a tudíž se derivatizační

postupy liší podle metody, druhu separované látky a biologické podstaty vzorku. Často se provádí blokování polárních funkčních skupin analytů, jako jsou -OH, -NH₂, -COOH atd. Tato blokace ovlivňuje a minimalizuje nežádoucí vedlejší interakce polárních skupin analytů v koloně a vede ke zlepšení separační účinnosti. Polární skupiny jsou, pomocí chemických derivatizačních reakcí, nejčastěji převáděny na methylestery, acetáty a silylery. [30, 33, 34]

Důvodem derivatizace separovaných látek v plynové chromatografii je zvýšení jejich těkavosti oproti původním látkám. Mastné kyseliny se proto převádějí na těkavější methylestery (FAME). Běžně se FAME připravují kyselé nebo bazicky katalyzovanou esterifikací. Pro bazickou esterifikaci se obvykle používá KOH nebo NaOH a pro kyselou HCl, BF₃ a H₂SO₄. Reakce katalyzovaná bází probíhá za mírných teplot a rychleji než reakce katalyzovaná kyselinou, avšak báze nejsou schopny katalyzovat esterifikaci volných mastných kyselin. BF₃ a H₂SO₄ se používají k derivatizaci méně často než methanolická HCl, protože HCl je relativně mírnější činidlo, poskytuje kvantitativní výtěžky, navíc při použití BF₃ a H₂SO₄ ve vysokých koncentracích a při vysokých teplotách můžou vznikat nežádoucí sloučeniny odvozené od mastných kyselin. Kombinace BF₃ s methanolickým NaOH je vysoce účinná při derivatizaci volných mastných kyselin, polárních lipidů, triacylglycerolů i esterů cholesterolu. K derivatizaci je možné použít i další činidla, např. trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH), který ale vykazuje nedostatečnou derivatizaci polynenasycených mastných kyselin. [33, 34]

1.6 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická a separační metoda, která umožňuje separaci složek směsi v čase. Metoda je založená na rozdílné afinitě zplyněných látek ke stacionární fázi. Je tedy možné analyzovat jen ty látky, které jsou schopné přejít do plynného skupenství. Metodou lze separovat jednoduché i složitější směsi látek. Stacionární fázi představuje buď pevný sorbent nebo kapalina zakotvená nebo chemicky vázaná na nosiči. Volba stacionární fáze závisí na chemické podstatě separovaných látek. Mobilní fázi tvoří inertní nosný plyn, který nemá afinitu ke stacionární fázi ani ke složkám vzorku a zajišťuje transport látek kolonou. V GC se často využívá technik s programováním parametrů a multidimenzionálních technik, jako je teplotní gradient nebo změna průtokové rychlosti plynu. [30, 35, 36, 37]

Vzorek je manuálně nebo automaticky nadávkován do dávkovače, kde dojde ke zplynění analytů, které jsou dále unášeny nosným plynem na kolonu, kde dojde k jejich rozdělení. Po separaci v koloně prochází analyty s nosným plynem detektorem, kde dojde na podkladě

fyzikálně chemické reakce k tvorbě a vyslání signálu do vyhodnocovacího softwaru. [35, 36, 37]

Sestava pro plynovou chromatografii se skládá ze zdroje nosného plynu, regulačních systémů průtoku, dávkovacího zařízení, jednoho či více termostatů, kolony, detektoru a vyhodnocovacího softwaru. Výsledkem analýzy je chromatogram, ve kterém každý pík reprezentuje jinou složku původní směsi. [30, 35, 36]

1.6.1 Nosný plyn

V GC se využívá plyn jako základní médium, které unáší vzorek z dávkovače přes kolonu až k detektoru. Jako nosný plyn se využívá např. helium, vodík, dusík nebo argon. Volba nosného plynu závisí na typu použitého detektoru, čistotě, viskozitě a hustotě, protože všechny tyto vlastnosti ovlivňují difúzi a průtok plynu kolonou. Plyny jsou skladovány v tlakových lahvích bez přístupu kyslíku. Nosný plyn musí být vysoce čistý, protože i malá kontaminace může určitým způsobem reagovat se vzorkem či kolonou. Tyto nežádoucí reakce se většinou projeví výskytem falešných píků, sníženou citlivostí nebo zvýšením šumu detektoru. Proto je nutné používat vysoce čisté plyny nebo doplnit systém o sorpční trapy zachycující např. vlhkost, uhlovodíky a kyslík. [30, 35, 36, 37]

Průtok nosného plynu může být konstantní nebo programově se měnící. Průtok ovlivňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu látek. K nastavení tlaků nosného plynu se využívá dvoustupňových nebo jednostupňových ventilů, přičemž dvoustupňové vykazují přesnější a stabilnější regulaci. [30, 35]

1.6.2 Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení slouží k přenesení zplyněného vzorku do proudu nosného plynu. Nejčastěji se využívá nástřikový port nebo dávkovací ventil. Dávkovací ventily používají dávkovací smyčku, která se naplní vzorkem a pak se po přepnutí ventilu převede veškerý obsah smyčky na kolonu. Nástřikovým portem prochází nadávkovaný vzorek z jehly přímo na kolonu. Protože nástřikový port nevyužívá dávkovací smyčku, ale jde přímo na kolonu, je jeho prostor vyhříván tak, aby došlo ke kvalitnímu zplynění vzorku dříve, než přijde na kolonu. Dávkovacími ventily i nástřikovými porty lze dávkovat plynné i kapalně vzorky. Teplota nástřiku by měla být asi o 50 °C vyšší než bod varu analyzované látky. [30, 35, 36]

Správné a reprodukovatelné dávkování vzorku je jedním z nejdůležitějších kroků GC analýzy. Vzorky se dají dávkovat manuálně i automaticky. Dávkovaný objem je obvykle 0,1 - 10 μ l. Dávkovače mohou být odpařovací nebo neodpařovací. Mezi odpařovací patří např. Split/splitless dávkovač. Mód Split představuje proces, kdy je vzorek nadávkován přímo do horké zóny, dojde k jeho rychlému odpaření a smíchá s nosným plynem. Dále se rozdělí na dvě části, přičemž pro vlastní analýzu je použita menší část (0,1 - 10 %) a zbytek je odveden do odpadu. Tuto metodu pak vyjadřuje tzv. Splitovací poměr. Využívá se u vzorků s vysokou koncentrací analyzovaných komponent. Volba způsobu dávkování závisí na požadavcích analýzy. [30, 35]

1.6.3 Termostat

Termostat zajišťuje udržení určité teploty, aby zplynění vzorku a analýza probíhala konstantně. Většinou má chromatograf samostatné termostaty dávkovače a kolony. Termostat kolony zaujímá největší prostor chromatografu. [35, 37, 38]

1.6.4 Kolona

V koloně dochází k separaci složek směsi na základě různé afinity analytů ke stacionární fázi v koloně. Kolony používané v plynové chromatografii mohou být náplňové nebo otevřené kapilární, kdy stacionární fáze je zakotvená na stěnách kapiláry. Náplňové kolony jsou většinou dlouhé od desítek centimetrů až po několik metrů a jsou plněné chromatografickou náplní s průměrem částic 100 - 250 μ m. Kolony jsou vyrobeny ze skla nebo oceli. Otevřené kapilární kolony jsou vyrobeny ze skla nebo taveného křemene a potažené polyimidem. Stacionární fáze je rozprostřena po vnitřní straně stěn kapiláry, kdy vrstva mívá výšku 0,1 - 10 μ m. Podle charakteru nanesené stacionární fáze rozlišujeme tři způsoby pokrytí vnitřní stěny kapiláry: kapalný polymer na vnitřní stěně kapiláry (WCOT), kapalný polymer zakotvený na nosiči zachyceném na vnitřní stěně kapiláry (SCOT) a absorbent zachycený na stěně kapiláry chemickou vazbou (PLOT). Délka kapilárních kolon se pohybuje od 15 do 100 m a její průměr je 0,1 - 0,7 mm. Kapilární kolony mají obecně vyšší účinnost a rozlišují větší počet separovaných látek. [30, 35, 36, 37, 39]

1.6.5 Detektory

Proud nosného plynu obsahující separované analyty je z kolony veden na detektor. Detektory, které se využívají v GC, se volí podle druhu stanovované látky a podle nosného plynu. Základní funkce je ovšem stejná. Pokud detektorem prochází čistý nosný plyn, je generován stabilní elektrický signál – základní linie. Když prochází detektorem stanovovaný analyt, elektrický signál se mění, vzniká chromatografický pík. Důležitými vlastnostmi detektorů používaných v GC analýze je stabilita signálu v čase, citlivost a rychlá odezva na změnu složení nosného plynu se vzorkem. [30, 35, 36, 37]

Detektory mohou být destruktivní i nedestruktivní. Jedním z univerzálních nedestruktivních detektorů je tepelně vodivostní detektor (TCD), který využívá rozdílů změn elektrického odporu mezi měrnou a referenční celou. Rozdíl v tepelné vodivosti je úměrný koncentraci stanovovaného analytu. Dalším často využívaným detektorem je plamenový ionizační detektor (FID). FID detektor je destruktivní a je schopen stanovit téměř všechny látky, které je možné spálit. Principem analýzy je, že eluát vycházející z kolony je spálen v plameni, dojde k chemicko-ionizační reakci a v důsledku přítomnosti analytu se mění procházející proud mezi dvěma elektrodami. FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky. Na stejném principu funguje i termoionizační detektor (TID), který je selektivní pro sloučeniny obsahující dusík a fosfor. [30, 35]

Mezi další používané detektory patří např. plamenový fotometrický detektor, detektor elektronového záchytu, který je selektivní zejména pro halogeny, nebo heliový ionizační detektor. Dále se také více častěji využívá spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, a to jak klasické, tak tandemové. [30, 40]

1.6.6 Charakteristiky z chromatogramu

Každý zobrazený pík na chromatogramu reprezentuje jinou složku původní směsi, které jsou oddělené základní čarou. Separované analyty charakterizuje jejich retenční čas (t_R), který se nachází na ose x. Hodnota t_R definuje čas, kdy určitý analyt projde kolonou. Z hodnoty t_R tedy vyplývá, že čím má analyt vyšší afinitu ke stacionární fázi, tím má vyšší hodnotu t_R a tím později eluuje z kolony. Na ose y je odezva detektoru. [30, 35, 36, 37]

Plynová chromatografie slouží k oddělení složek přítomných ve vzorku a také k jejich kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení. Hlavní kvalitativní charakteristikou plynové chromatografie je retenční čas (t_R) a hlavní kvantitativní charakteristikou je plocha

chromatografického píku či výška píku (w). Tyto parametry můžeme vyhodnotit z chromatografického záznamu. [30, 35, 36, 37]

Stanovení MK se nejčastěji provádí metodou GC s použitím kvalitních kapilárních kolon, případně jejím spojením s hmotnostní spektrometrií. Nejdříve však musí dojít k derivatizaci samotných mastných kyselin a k rozdělení do jednotlivých lipidových frakcí. [30, 37]

1.6.7 Trend spojení plynové chromatografie s MS analýzou

Spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem ve funkci detektoru nabízí výhody a pokrok v analýze různých druhů metabolitů. Jedná se o poměrně robustní metodu, schopnou s vysokou přesností identifikovat a kvantifikovat analyzované látky. Reprodukovatelné vzorce molekulární fragmentace z této metody dělají jednu z nejspolehlivějších nástrojů pro studium metabolomů. Opět je možné stanovovat jen těkavé analyty, ale tento problém se řeší derivatizací zkoumaných látek tak jako v prosté GC analýze. [38, 40]

Látky separované na GC koloně proudí přes vyhřívanou spojku, která udržuje analyty v plynném stavu, do ionizačního zdroje MS. Ionizované fragmenty analytů putují dále k hmotnostnímu analyzátoru, kde jsou analyzovány podle svého poměru m/z . Detektory používané v GC analýze ve valné většině pracují za atmosférického tlaku, zatím co MS analýza za podstatně sníženého tlaku. Převodem separovaných látek z GC detektoru do MS dochází ke zkracování retenčních časů analytů z důvodu sníženého tlaku na GC detektoru kvůli spojení s MS. [38, 40]

Výstupem GC-MS analýzy je chromatogram a hmotnostní spektrum, kdy chromatogram poskytuje informace o kvantitě analyzované látky a hmotnostní spektrum o kvalitativní charakterizaci stanovovaného analytu. [38, 40]

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo, pomocí plynové chromatografie, stanovit koncentrace vybraných mastných kyselin plazmy v izolovaných lipidových frakcích pacientů trpících adrenoleukodystrofií, získaná data statisticky vyhodnotit a porovnat jednotlivé naměřené koncentrace s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Analýza byla provedena se zaměřením na tzv. minoritní mastné kyseliny jako je např.: kyselina myristová, sapiňová nebo eikosapentaenová. Snahou bylo zjistit, zda by se i tyto mastné kyseliny daly použít jako další biochemické markery pro diagnózu adrenoleukodystrofie.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Přístroje

- Plynový chromatograf (Agilent Technologies 7890A GC Systém, Santa Clara, Kalifornie 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), (AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, Kalifornie USA)
- Termoblok (Pierce Reacti-Therm Heating/Stirring Module a odpařovací zařízení, model 18971 a 18821), (THERMOSCIENTIFIC, Asheville, Severní Karolína USA)
- Centrifuga MPW-340 (MECHANYKA PRECYZNA, Polsko)
- Vortex typ Reax top (HEIDOLPH INSTRUMENTS GMBH & CO. KG, Schwabach, Německo)

3.1.2 Pomůcky

- Chromatografické desky TLC Silica gel 60 Glass plates 20x20 cm (MERCK, 642 71 Darmstadt, Německo)
- Lampa UV 240 (A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Německo)
- Magnetická míchadla 10x6 mm (P-LAB, Praha, Česká republika)
- Zkumavky Pyrex s teflonovým těsněním (BARLOWORLD SCIENTIFIC GROUP LIMITED Staffordshire, Velká Británie)
- Chromatografické vialky s pryžovým septem, typ 5188-6599 (AGILENT TECHNOLOGIES, 5301 Santa Clara, Kalifornie USA)
- Inserty do chromatografických vialek, typ 8010-0132 (AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, Kalifornie USA)
- Desaga spray gun (Dünnschicht-chromatographie, Thin-layer) (Desaga GmbH D-690 Heidelberg, Německo)
- Chromatografická vana
- Automatické pipety (Eppendorf, Hamburg, Německo), (100, 250, 500, 1000 μl)
- Skleněné pipety (1, 5, 10 ml)
- Pasteurovy skleněné kapiláry
- Kádinky, odměrné válce, zkumavky, stojánky na zkumavky, špachtle

3.2 Chemikálie a další materiál

3.2.1 Deproteinační roztok

- 2-propanol, p.a., $\omega = 99,95 \%$, $M_r = 60,1 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,78 \text{ g/cm}^3$, šarže: PP/2017/02567 (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- n-heptan, p.a., $\omega = 98,25 \%$, $M_r = 100,21 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,68 \text{ g/cm}^3$, šarže: PP/2010/14672 (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- kyselina orto-fosforečná, p.a., $\omega = 85 \%$, $M_r = 98 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,7 \text{ g/cm}^3$, číslo šarže: 1801230113 (PENTA, Praha 6, Česká republika)

3.2.2 Mobilní fáze TLC

- n-hexan, p.a., $\omega = 99 \%$, $M_r = 86,18 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,659 \text{ g/cm}^3$, šarže: 2703070322 (PENTA, Praha 6, Česká republika)
- diethylether, p.a. nestabilizovaný, $\omega = 99,7 \%$, $M_r = 74,12 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,714 \text{ g/cm}^3$, šarže: 2611091121 (PENTA, Praha 6, Česká republika)
- kyselina octová p.a., $\omega = 99 \%$, $M_r = 60,05 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,050 \text{ g/cm}^3$, šarže: 1907280714 (PENTA, Praha 6, Česká republika)

3.2.3 Další chemikálie

- methanol, p.a., $\omega = 99,98 \%$, $M_r = 32,04 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,79 \text{ g/cm}^3$, šarže: 2612171221 (PENTA, Praha 6, Česká republika)
- toluen, p.a., $\omega = 99,28 \%$, $M_r = 92,14 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,87 \text{ g/cm}^3$, šarže: PP/2021/08282 (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- chloroform, p.a., stabilizovaný, 1 % ethanol, $\omega = 99,8 \%$, $M_r = 119,38 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,447 \text{ g/cm}^3$, šarže: 2204030417 (PENTA, Praha 6, Česká republika)
- acetylchlorid, $\omega = 98 \%$, $M_r = 75,5 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,104 \text{ g/cm}^3$, šarže: STBK1935 (SIGMA-ALDRICH Steinheim, Německo)
- uhličitan draselný, p.a., $\omega = 99,7 \%$, $M_r = 138,21 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,447 \text{ g/cm}^3$, šarže: 2608030821V (PENTA, Praha 6, Česká republika)
- plazma – standard pro TLC

3.2.4 Detekční činidlo

- 2,7-dichlorfluorescein, $M_r = 401,2 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,050 \text{ g/cm}^3$, šarže: D6665-5G (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Německo)

3.2.5 Standard pro GC

- kyselina *cis*-13,16,19 dokosatrienová (Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko)

3.2.6 Tlakové láhve

- dusík N_2 , 4.0, UN 1066 (Linde Gas a.s., Praha 9, Česká republika)
- helium He , 5.0, UN 1046 (Linde Gas a.s., Praha 9, Česká republika)
- vodík H_2 , 5.0 $\geq 99,999$ (Linde Gas a.s., Praha 9, Česká republika)
- kyslík O_2 , 20% (zbytek dusík), UN 1956 (Linde Gas a.s., Praha 9, Česká republika)

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Analyzované vzorky

Vzorky plazmy pacientů s adrenoleukodystrofií, které byly analyzovány v této diplomové práci, byly poskytnuty Lékařskou fakultou Univerzity Tübingen v Německu. Zpracování vzorků proběhlo v souladu s předpisy etické komise a všichni vybraní pacienti podepsali informovaný souhlas s odběrem žilní krve pro vědecké a studijní účely. Celkem bylo analyzováno 10 vzorků pacientů s diagnózou adrenoleukodystrofie a 11 vzorků zdravé kontroly. Plazma byla z plné žilní krve získána centrifugací, uchovávána při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ a převezena na Fakultu chemicko-technologickou Univerzity Pardubice, kde byly vzorky zpracovávány.

3.3.2 Příprava standardů a kalibrace

Pro sestavení kalibrační křivky bylo použito 5 roztoků, které vznikly smícháním naředěných standardů vybraných mastných kyselin. Ke každému roztoku bylo přidáno 4 ml methanolu. Směs byla důkladně zvortexována a do zkumavek napipetováno 0, 50, 100, 200 a 400 μl . Po odpaření do sucha byl odparek rozpuštěn v 500 μl poolové plazmy a přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku, který byl připraven smícháním 2-propanolu, n-hexana a 2 M H_3PO_4 v poměru 40:20:1. Směs byla 10 minut inkubována v laboratoři, promíchána a byl k ní přidán 1 ml vnitřního standardu o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a 1,5 ml destilované vody. Směs byla opět

promíchána a následně centrifugována po dobu 10 minut při 3000 ot/min. Horní organická vrstva byla odpipetována do připravených zkumavek a odpařena do sucha. Dále byla provedena metoda TLC (viz. kapitola 3.3.4). Pro kalibrační křivku byla použita pouze frakce volných mastných kyselin.

3.3.3 Extrakce lipidů a denaturace proteinů

Do kónických zkumavek bylo pipetováno 500 μ l vzorku séra nebo standardu a přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku o složení 2-propanol, n-hexan a 2 M H_3PO_4 (40:20:1). Směs byla promíchána na vortexu a 10 min kondicionována při laboratorní teplotě. K obsahu ve zkumavce byl přidán 1 ml směsi toluen:methanol (4:1) a 1,5 ml destilované H_2O . Směs byla promíchána na vortexu a následně centrifugována po dobu 10 min při 3000 ot./min. Horní organická vrstva byla odpipetována do čisté zkumavky a v digestoři odpařena do sucha pod proudem dusíku.

3.3.4 Separace metodou TLC

a) Příprava chromatografické desky

Měkkou tužkou byly na chromatografické desce vyznačeny jednotlivé dráhy, čelo, start a okraje. Start byl označen ve vzdálenosti 2,5 cm od spodní hrany desky, čelo ve vzdálenosti 1 cm od horního hrany desky a boční okraje ve vzdálenosti 1 cm od pravé i levé hrany desky. Vyznačená plocha desky byla rozdělena do šesti drah širokých 3 cm.

b) Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml 98% kyseliny octové. Směs byla přelita do chromatografické vany, kde byla ponechána 30 až 40 minut před vložení desky, aby parami nasýtila prostor chromatografické vany.

c) Vlastní TLC

K odparku bylo přidáno 75 μ l směsi chloroform:methanol (2:1) a skleněnými Pasteurovými pipetami postupně nanesen celý objem pěti vzorků a standardu na startovací čáru chromatografické desky. Vzorky byly na desku nanášeny tak, aby nedošlo k poškození jejího

povrchu, což by mohlo ovlivnit migraci jednotlivých složek. Každý vzorek byl nanášen na start cca v šesti vrstvách krátkými tahy do středu dráhy. Poté byly zkumavky vypláchnuty 25 μ l směsí chloroform:methanol (2:1) a postup nanášení zopakován. Standard nanesený do šesté dráhy je nezbytný k identifikaci jednotlivých frakcí vzorků. Zaschnutá chromatografická deska byla vložena do chromatografické vany, dokud mobilní fáze nedosáhla startovací linie. Poté byla vyndána z vany ponechána znovu na zaschnutí. Po zaschnutí byla deska opět vložena do chromatografické vany a byla vyvíjena, dokud mobilní fáze nedosáhla vyznačené linie čela. Po dosažení mobilní fáze k čelu desky, byla deska vyjmuta z vany a sušena v digestoři. Tímto procesem byly separovány frakce fosfolipidů (PL), diacylglycerolů (DG), cholesterolu, vyšších mastných kyselin (VM), triacylglycerolů (TG) a esterů cholesterolu (ECH).

d) Detekce frakcí

V oblasti dráhy standardu byl na chromatografickou desku rovnoměrně rozprášen 2,7,-dichlorfluorescein. Pro zviditelnění jednotlivých frakcí byla použita UV lampa.

e) Izolace jednotlivých frakcí

Podle standardu byly měkkou tužkou označeny jednotlivé frakce v ostatních drahách tak, aby od horního i dolního okraje skvrny zbývalo cca 0,5 cm. Označená jednotlivá pole byla vyškrábána z chromatografické desky do pyrexových zkumavek s víčkem s teflonovým těsněním.

3.3.5 Derivatizace, převedení na methylestery

Do zkumavek s vyškrábanými frakcemi byl přidán 1 ml interního standardu pro GC o koncentraci 10 μ g/ml, 1 ml směsí toluen:methanol (4:1) a magnetické míchátko. Dále bylo ke vzorkům přidáno 200 μ l acetylchloridu, který byl použit jako katalyzátor esterifikace. Zkumavky byly pevně uzavřeny a vloženy do magnetického termobloku, vyhřátého na 100 °C a po dobu 1 hodiny probíhala esterifikační reakce. Po uplynutí reakční doby byly zkumavky vytemperovány na laboratorní teplotu stáním v digestoři. Neutralizační reakce byla provedena přidáním 5 ml 6% roztoku K_2CO_3 . Směs byla po dobu dvou minut intenzivně protřepávána a následně centrifugována 10 min při 3000 ot./min. Horní organická fáze byla odpipetována

a odpařena do sucha v digestoři pod proudem dusíku. K odparku bylo přidáno 100 μ l směsi methanol:toluen (1:4). Směs byla promíchána na vortexu a přepipetována do chromatografických vialek s insertem, které byly uzavřeny víčkem s pryžovým septem.

3.3.6 Separace metodou GC

Vialky se vzorky byly vyrovnány do karuselu plynového chromatografu Agilent Technologies 7890A s plamenově ionizačním detektorem a byl nastaven teplotní program:

- Počáteční teplota: 130 °C po dobu 1 min
- Teplotní gradient:
 - o 2 °C/min do teploty 176 °C po dobu 2 min
 - o 1 °C/min do teploty 186 °C po dobu 1 min
 - o 0,2 °C/min do teploty 190 °C po dobu 1 min
 - o 1 °C/min do teploty 220 °C po dobu 4 min

Celkový čas analýzy jednoho vzorku byl 92 minut a měření probíhalo v módu split v poměru 10:1.

3.3.7 Analýza výsledků

K identifikace jednotlivých mastných kyselin ve vzorku byly využity retenční časy methylesterů mastných kyselin standardního roztoku. Veškeré chromatogramy byly integrovány v programu GC Chem32/CORA. Konečné koncentrace jednotlivých mastných kyselin byly získány přepočtem na interní standard, pomocí výpočetního programu Microsoft Office Excel a Statistica 14.

4 VÝSLEDKY

4.1 Soubor pacientů a zdravých kontrol

Pacienti, jejichž plazma byla analyzována v této diplomové práci, trpí adrenoleukodystrofií v různém stádiu nemoci a projevují se u nich různé symptomy. U všech pacientů bylo provedeno stanovení koncentrace mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a stanovení jejich poměrů podle standardních laboratorních postupů. Totéž bylo provedeno u zdravých kontrolních jedinců.

4.2 Stanovované mastné kyseliny

V této diplomové práci byl identifikován panel 40 různých MK, mezi které patří skupina LCFA, do které se řadí např. kyselina myristová (14:0), palmitová (16:0) a sterarová (18:0), které mají významný aterogenní a trombogenní potenciál. Dále VLCFA, do které patří např.: kyselina arachová (20:0), behenová (22:0) a cerotová (24:0), které jsou obsaženy v měřitelných koncentracích u pacientů s vrozenými metabolickými poruchami jako je právě adrenoleukodystrofie. Z MUFA s *cis* konformací jsem se zaměřila na kyselinu olejovou (18:1 n-9), palmitolejovou (16:1 n-7) a nervonovou (24:1 n-9). Z *trans* MUFA pak na kyselinu vakcenovou (18:1 n-9t), která představuje vyšší aterogenní riziko. Z PUFA jsem se zaměřila na řadu ω -3 a ω -6 mastné kyseliny, které mají výrazný antiaterogenní a antitrombotický účinek, který je dán jejich celkovým působením na koncentraci lipoproteinů. Z ω -6 se jedná o kyselinu linolovou (18:2 n-6) a její metabolické produkty jako je γ -linolenová (18:3 n-6) a arachidonová (20:4 n-6). Dále na minoritní kyselinu dokosapentaenovou (22:5 n-6). Omega-6 MK kyseliny jsou obecně schopné snižovat koncentraci cholesterolu. Z ω -3 jsem zkoumal kyselinu linolenovou (18:3 n-3) a její metabolické produkty jako je eikosapentaenová (20:5 n-3), dokosaheptaenová (22:6 n-3) a dokosapentaenová (22:5 n-3), u kterých jejich vyšší počet dvojných vazeb zvyšuje pravděpodobnost lipoperoxidace. PUFA n-3 vykazují imunomodulační aktivitu, která souvisí s jejich schopností potlačovat aktivaci T-lymfocytů. Také jsem se zabývala methylovanými mastnými kyselinami jako kyselina 12-methyltridekanová (12M-13:0) nebo 16-methylheptadekanová (16M-17:0). [1, 2]

Průměrné hodnoty koncentrací jednotlivých kyselin patologických vzorků a kontrolních vzorků jsou udávány v $\mu\text{mol/l}$ a byly určeny jejich směrodatné odchylky. Statisticky významné změny koncentrace jednotlivých MK se nacházejí pouze v případech, že hodnota hladiny p je menší než 0,05.

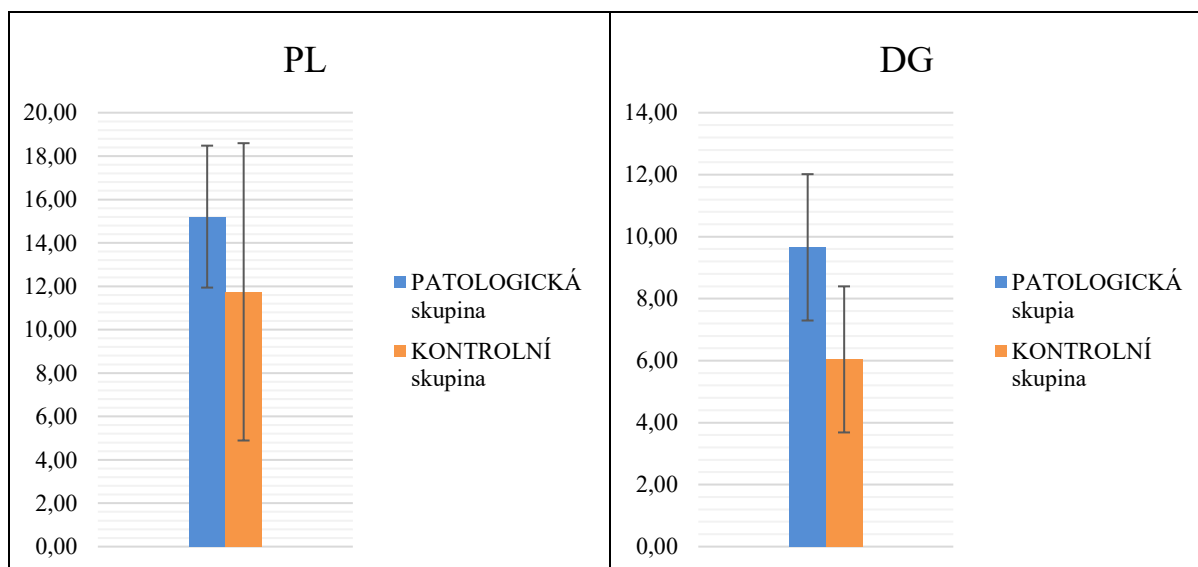
4.3 Minoritní mastné kyseliny

Po stanovení panelu mastných kyselin a porovnání jejich koncentrací se zdravými kontrolami jsem vybrala 8 tzv. minoritních mastných kyselin, které se svými koncentracemi lišily u pacientů s adrenoleukodystrofií a zdravými jedinci ve všech nebo alespoň ve třech lipidových frakcích. U těchto MK předpokládáme, že by mohly mít určitou spojitost s tímto onemocněním a jejich určování by mohlo být také použitelné při diagnostice.

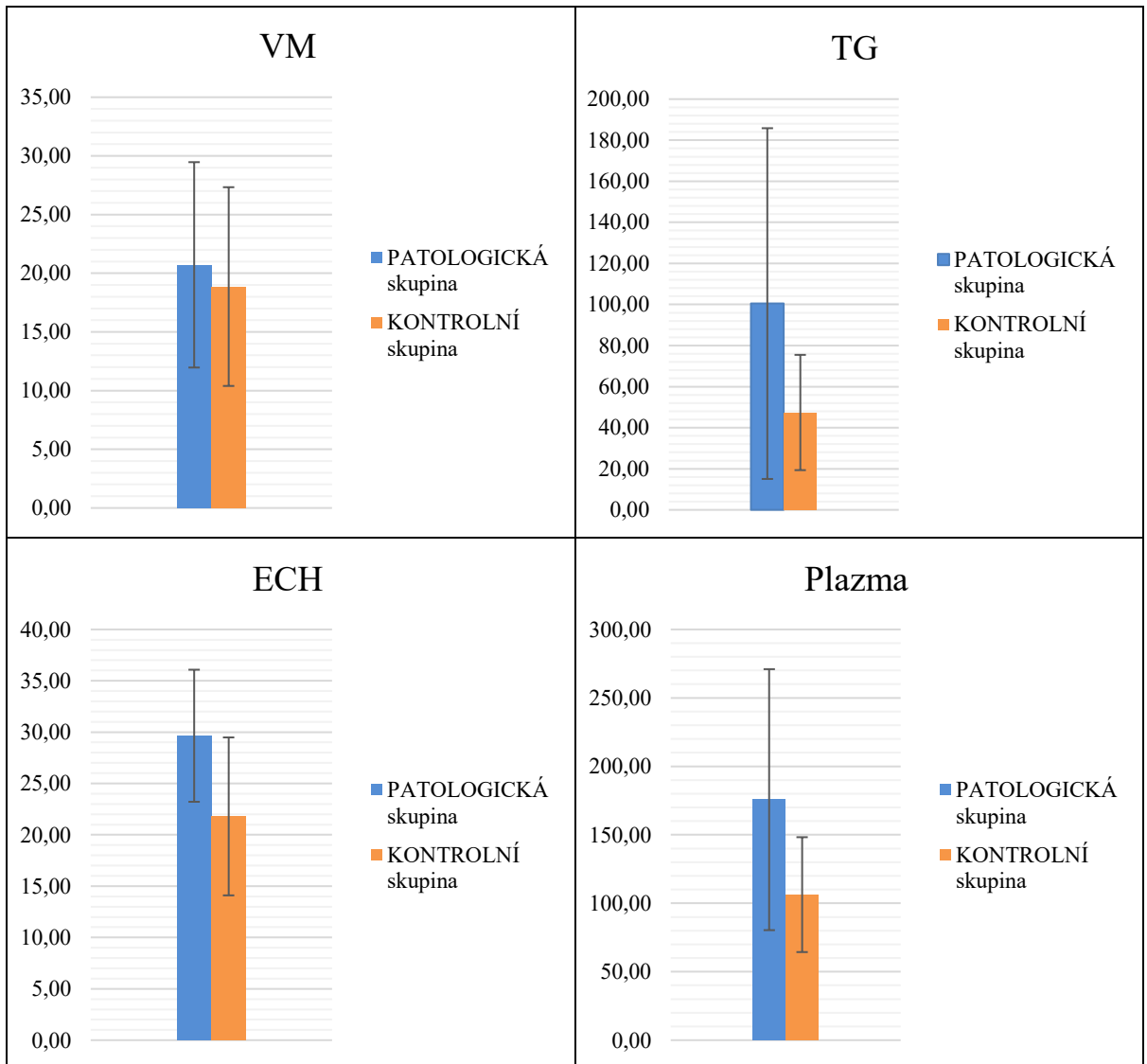
Konkrétně se jedná o: a) kyselinu myristovou (14:0), b) kyselinu pentadekanovou (15:0), c) kyselinu sapienovou (16:1 n-10), d) kyselinu *cis* palmitoolejovou (16:1 n-9), e) kyselinu *cis* vakcenovou (18:1 n-7), f) kyselinu oktadekadienovou (18:2 – 9Z, 11E) g) kyselinu oktadekadienovou (18:2 – 10Z, 12Z) a h) kyselinu eikosapentaenovou (20:5 n-3).

4.4 Kyselina myristová (14:0) a její hodnoty

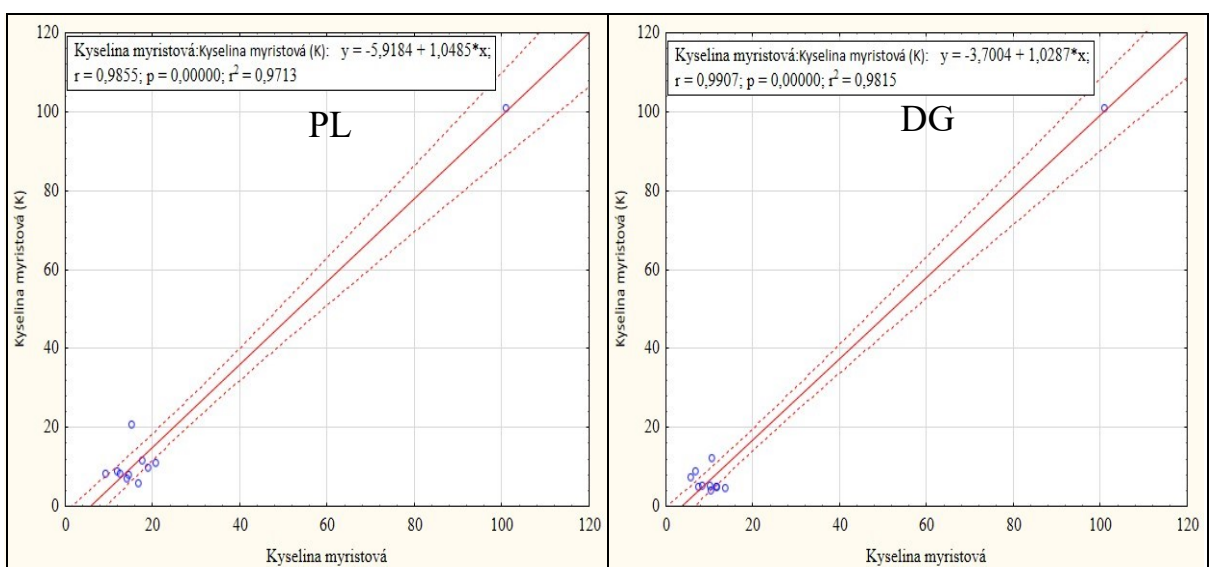
Při porovnání naměřených dat kyseliny myristové jsem zjistila, že její koncentrace je všeobecně zvýšená u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti zdravé kontrole ve všech frakcích viz. Graf 1. Zvýšenou hodnotu koncentrace u patologické skupiny potvrzuje i celkové vyšší hodnota v plazmě pacientů s ALD viz. Graf 1 (Plazma). Zdá se, že kyselina myristová se kumuluje převážně v TG frakci viz. Graf 1 (TG), ale kvůli vysoké odchylce zprůměrovaných hodnot koncentrací a vyšší hodnotě hladiny p viz. Graf 2 (TG), není zcela jisté, zda to lze s určitostí potvrdit. Koncentrace v dalších frakcích je cca srovnatelná a ze statistického hlediska je přítomná signifikantní změna u nemocných oproti kontrolní skupině ve všech frakcích kromě frakce TG a celkové plazmy viz. Graf 2.



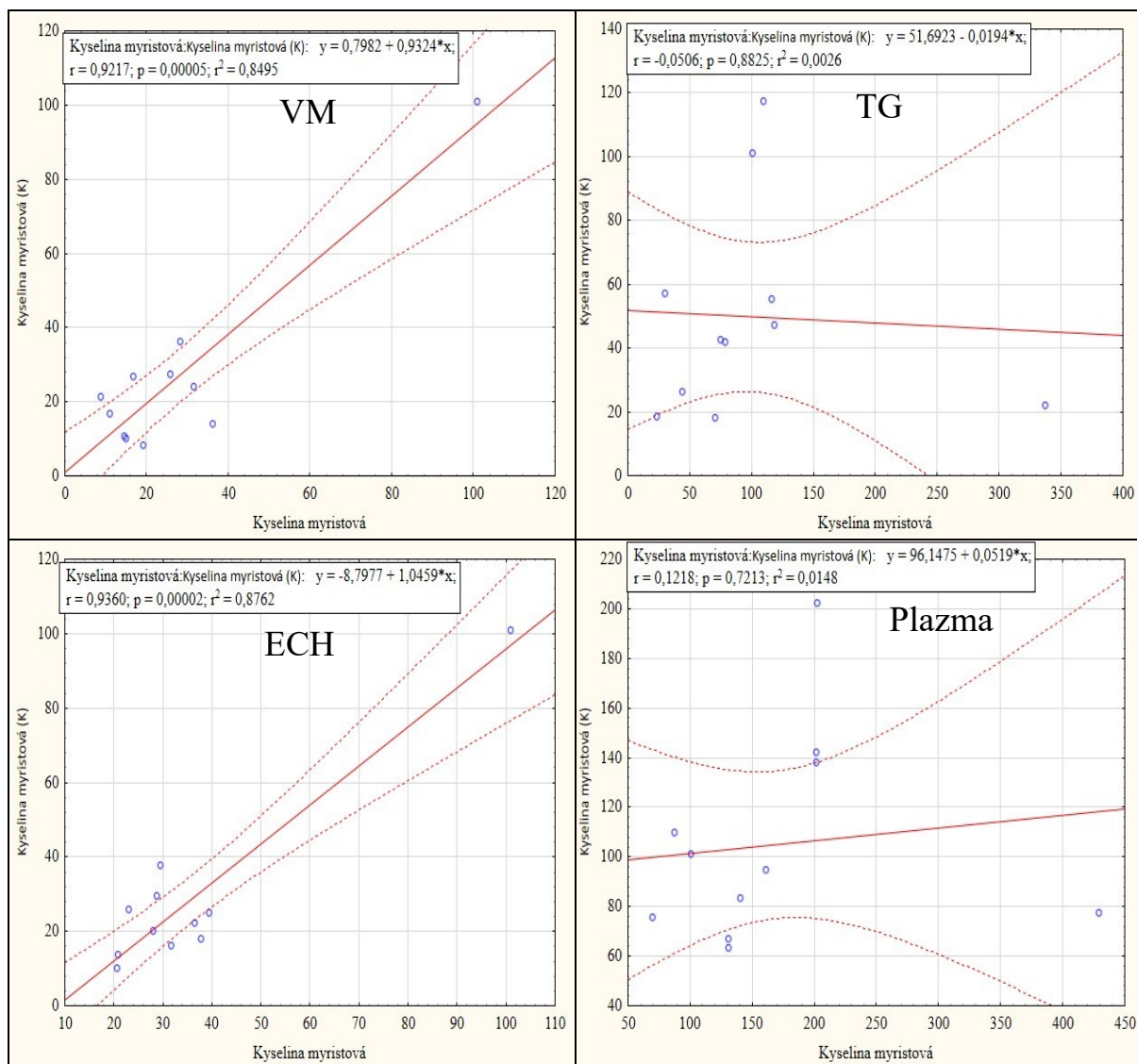
Graf 1: Hodnoty kyseliny myristové



Graf 2: Hodnoty kyseliny myristové - pokračování



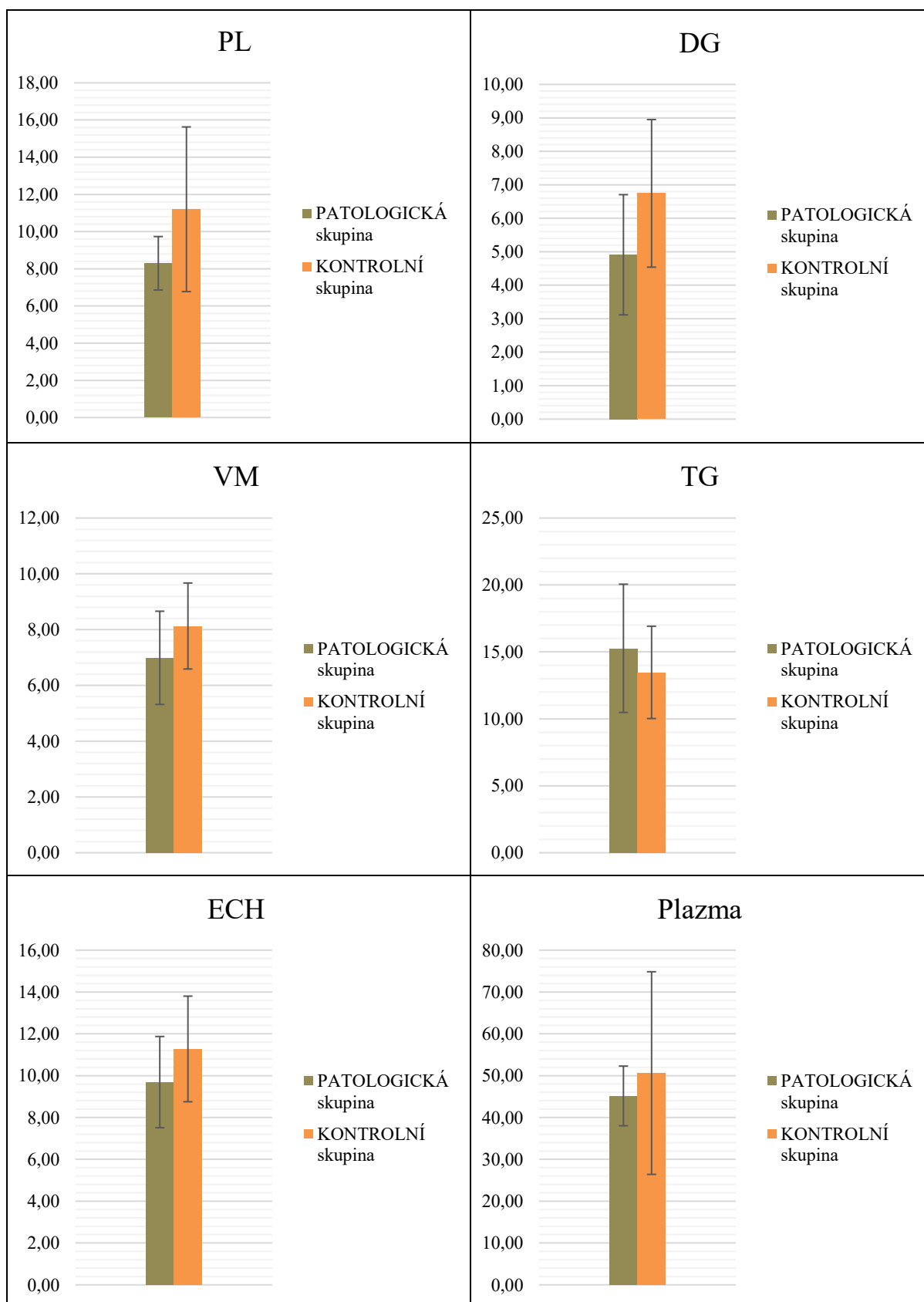
Graf 3: Statistika kyseliny myristové



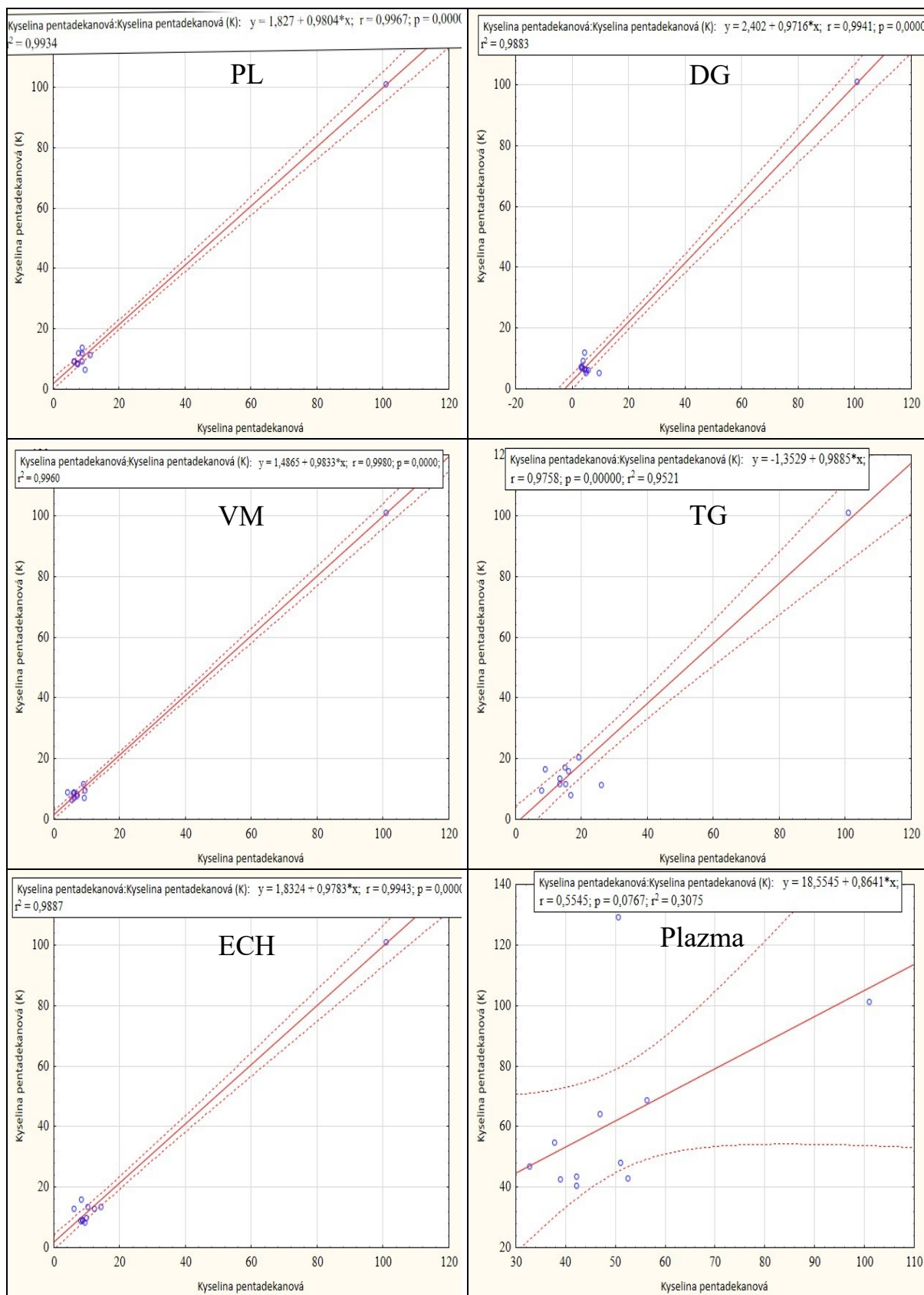
Graf 4: Statistika kyseliny myristové - pokračování

4.5 Kyselina pentadekanová (15:0) a její hodnoty

Porovnání naměřených dat kyseliny pentadekanové ukázalo, že její koncentrace je všeobecně signifikantně snižena u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti zdravé kontrole ve všech frakcích, viz. Graf 3 a Graf 4, kromě TG, kde je její koncentrace naopak statisticky významně zvýšená viz. Graf 4 (TG). Snižovanou hodnotu koncentrace u patologické skupiny vykazuje i celkově nižší hodnota v plazmě pacientů s ALD viz. Graf 4 (Plazma), ale tato změna však není signifikantní.



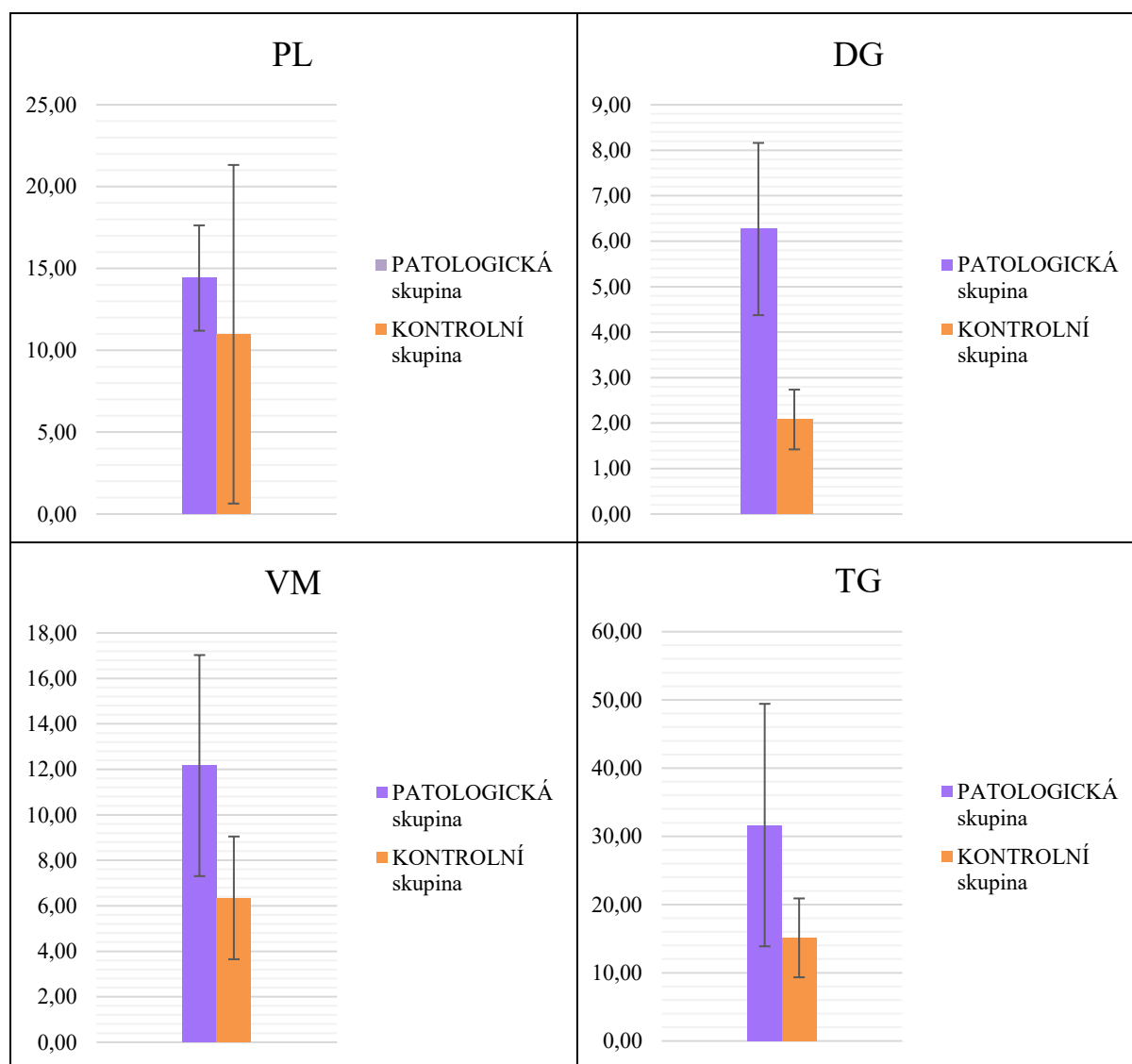
Graf 5: Hodnoty kyseliny pentadekanové



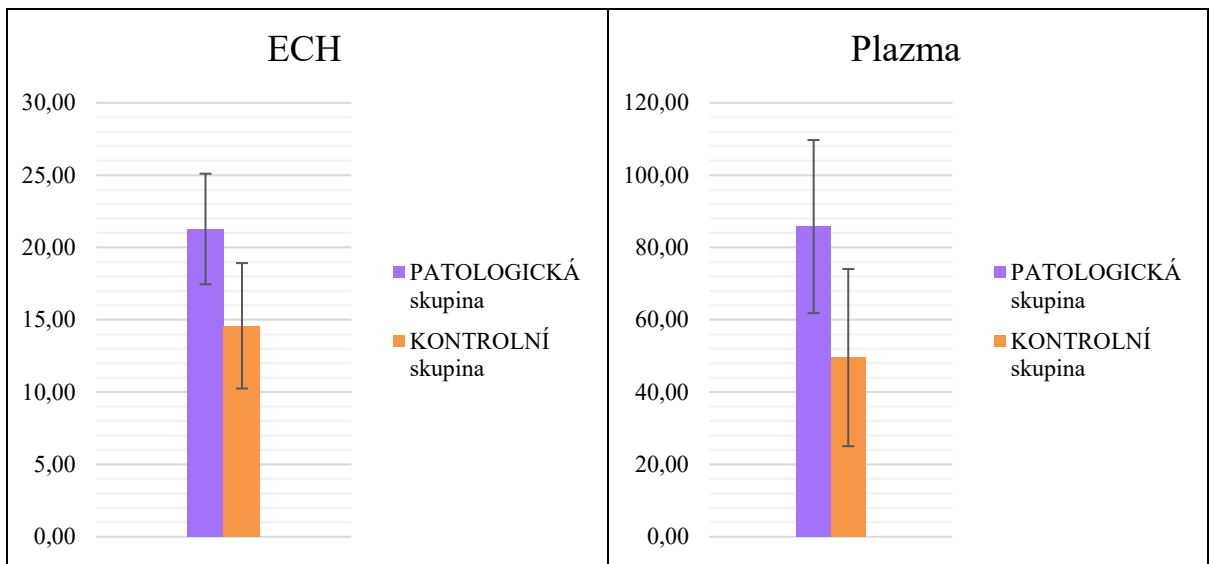
Graf 6: Statistika kyseliny pentadekanové

4.6 Kyselina sapienová (16:1 n-10) a její hodnoty

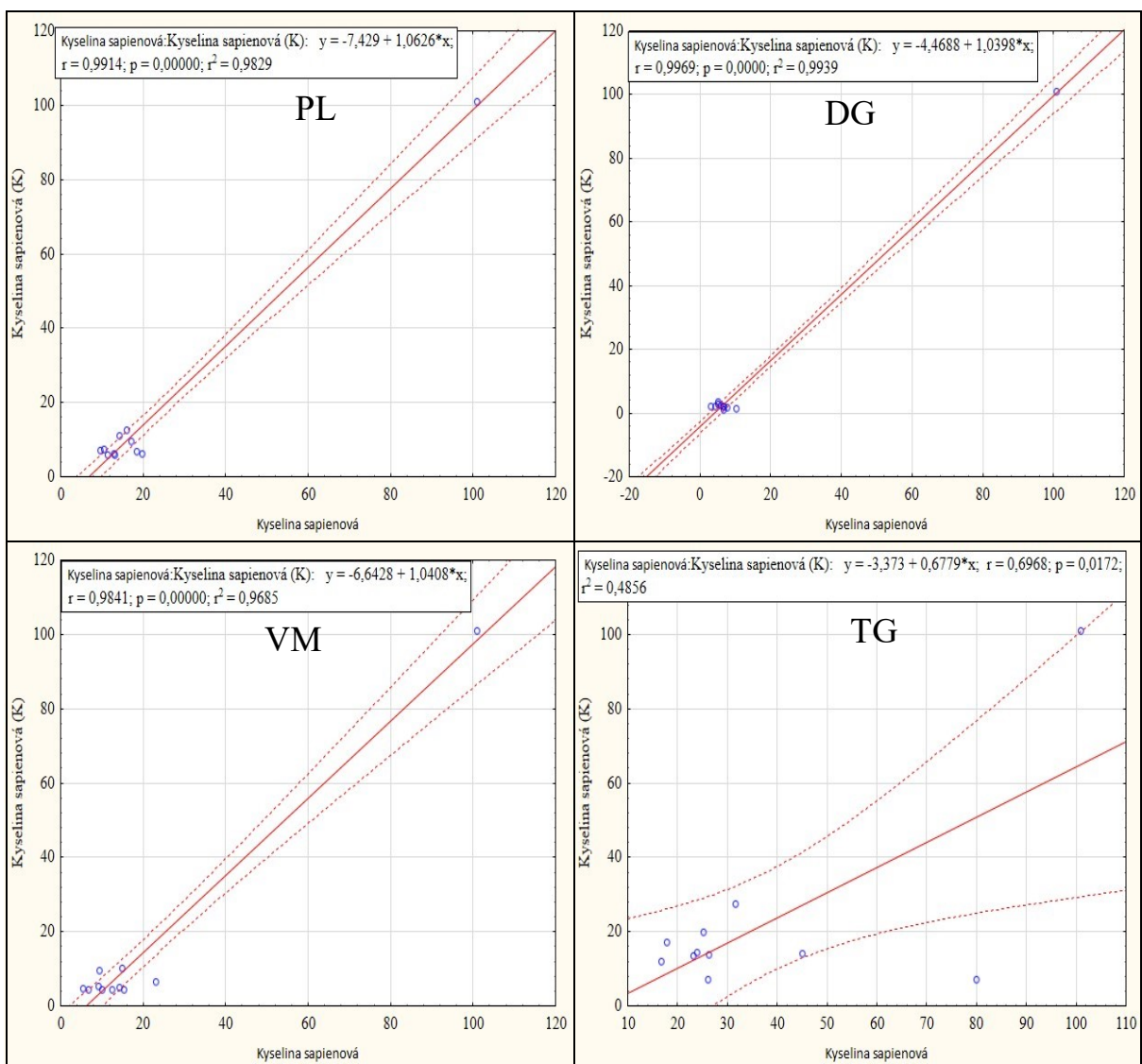
Zkoumání naměřených dat kyseliny sapienové ukázalo, že její koncentrace je všeobecně signifikantně zvýšená u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti kontrolní skupině ve všech frakcích viz. Graf 5 a Graf 6. Zvýšenou hodnotu koncentrace u patologické skupiny vykazuje i celkově vyšší hodnota v plazmě pacientů s ALD viz. Graf 1 (Plazma). Tato změna ale není statisticky významná viz. Graf 6 (Plazma). Signifikantní výsledky naznačují, že kyselina sapienová se kumuluje převážně v TG a ECH frakci viz. Graf 5 (TG, ECH) a Graf 6 (TG, ECH). Nejnižší koncentraci vykazuje kyselina sapienová v DG frakci viz. Graf 5 (DG).



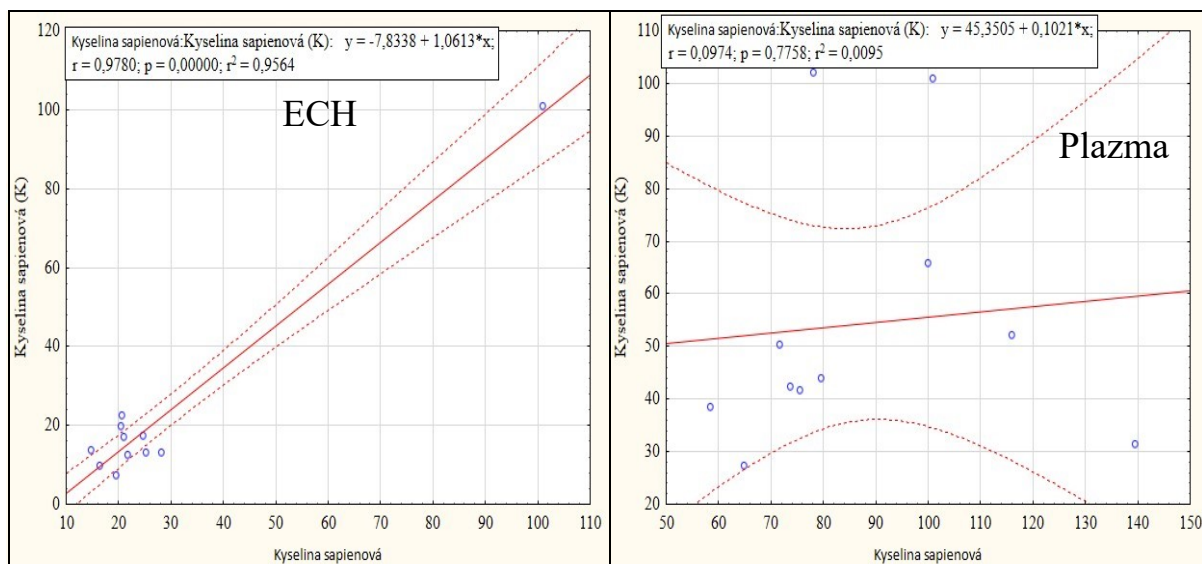
Graf 7: Hodnoty kyseliny sapienové



Graf 8: Hodnoty kyseliny sapienové - pokračování



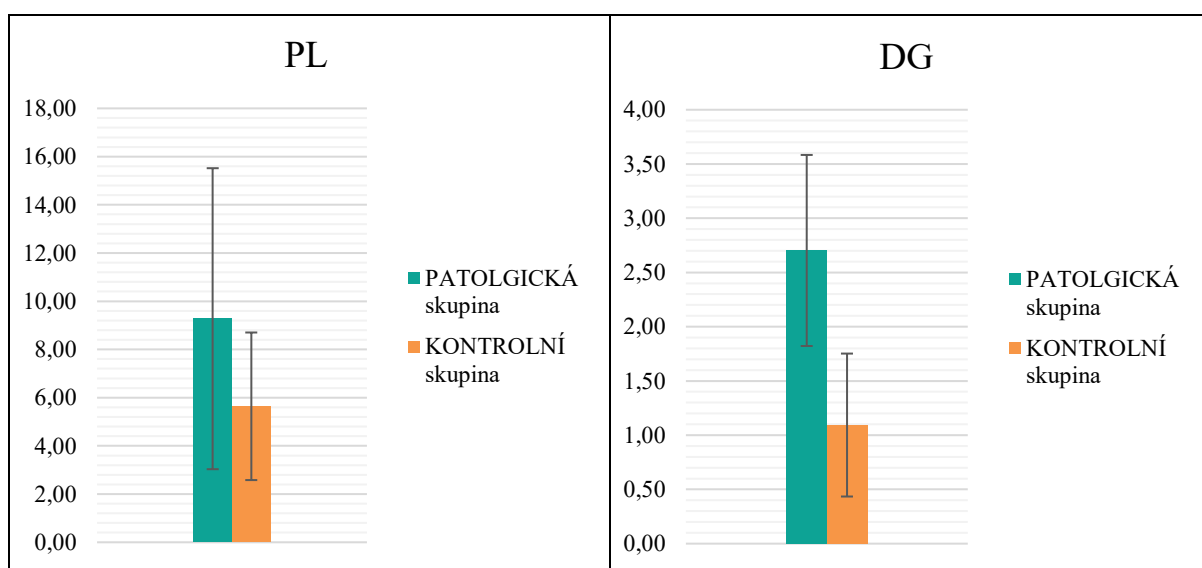
Graf 9: Statistika kyseliny sapienové



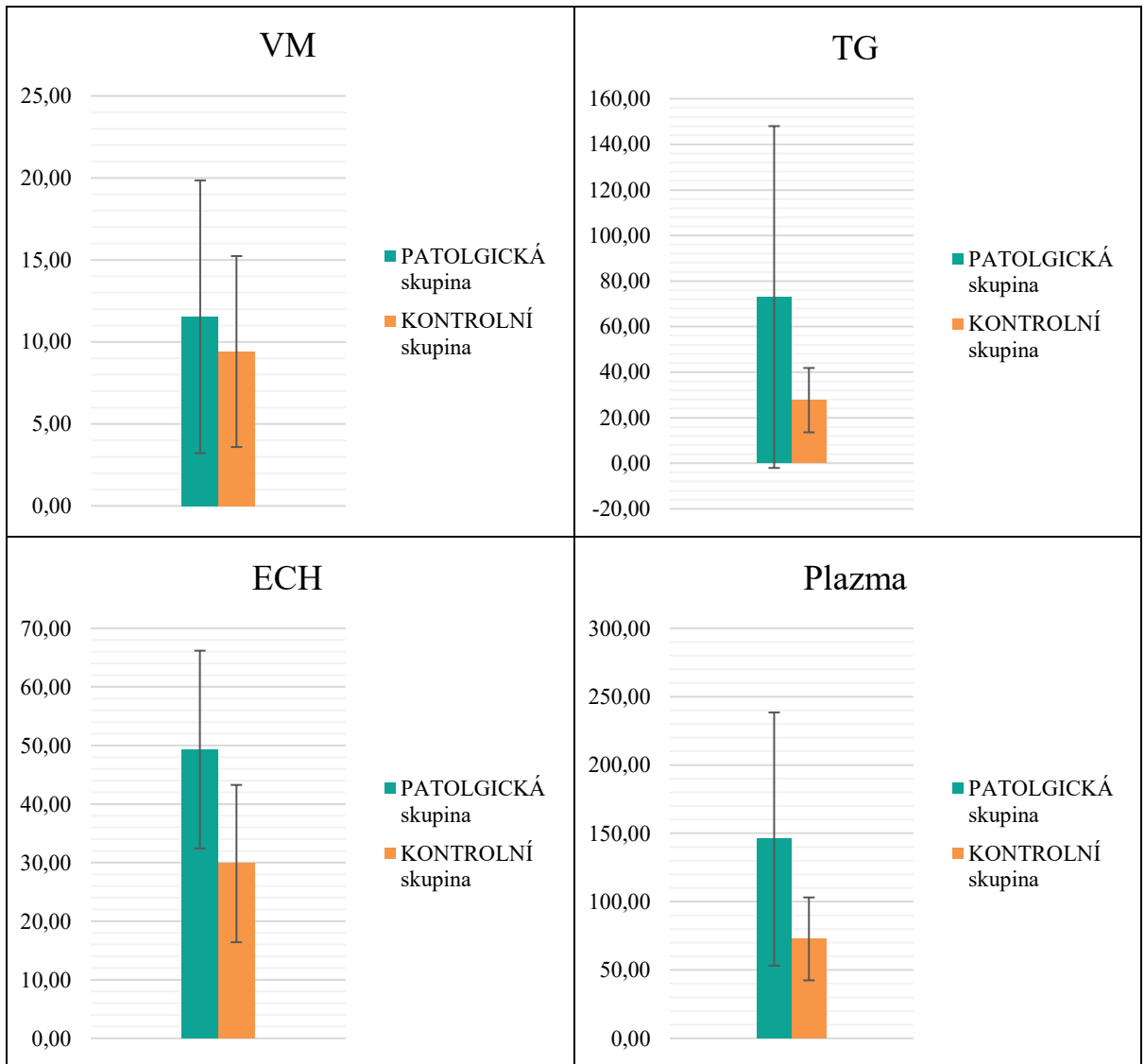
Graf 10: Statistika kyseliny sapienové - pokračování

4.7 Kyselina *cis* palmitoolejová (16:1 n-7) a její hodnoty

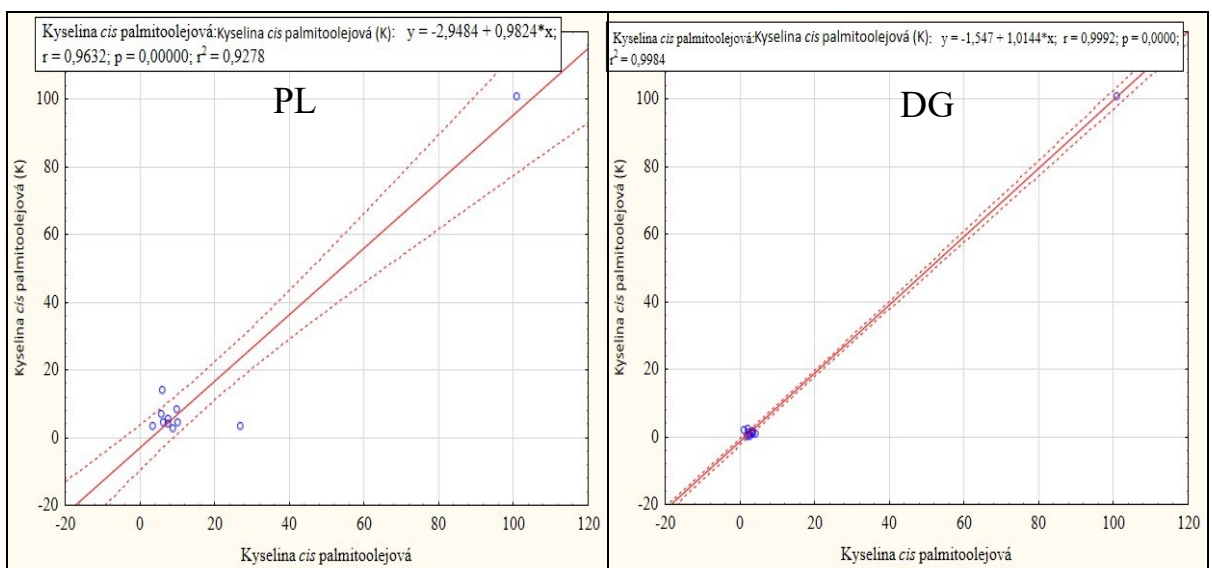
Hodnocením získaných dat kyseliny *cis* palmitoolejové jsem určila, že její koncentrace je statisticky významně zvýšená u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti zdravé kontrole, a to ve všech frakcích, kromě TG viz. Graf 7 a Graf 8. Zvýšená hodnotu koncentrací u patologické skupiny, ve stanovovaných frakcích, koreluje se zvýšenou celkovou koncentrací kyseliny *cis* palmitoolejové v plazmě pacientů viz. Graf 7 (Plazma), která ale není signifikantní viz. Graf 8 (Plazma). Nejvyšší hodnotu koncentrace vykazuje ECH frakce viz. Graf 7 (ECH). Naopak nejnižší hodnoty koncentrací se nacházejí v DG frakci viz. Graf 7 (DG).



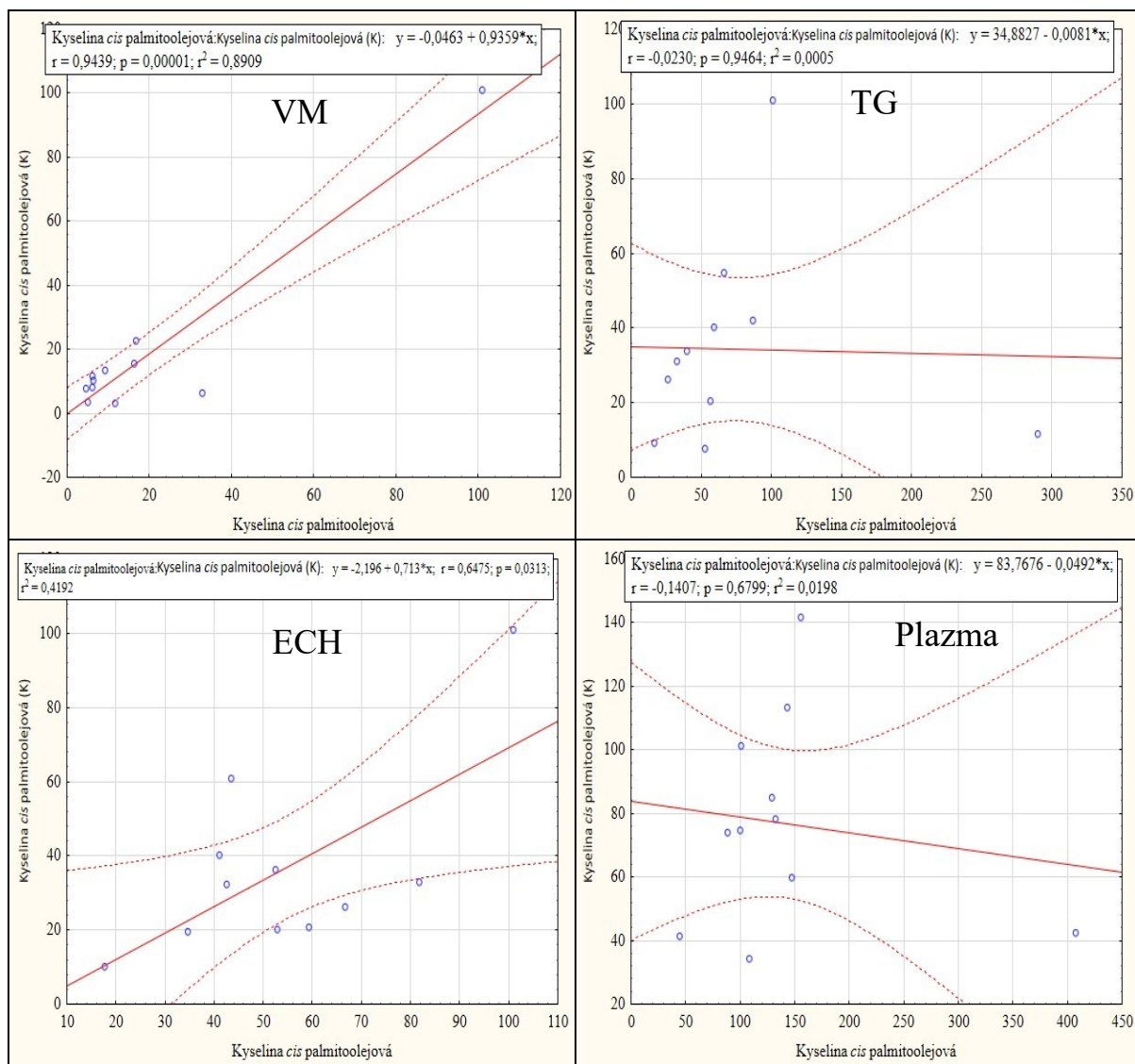
Graf 11: Hodnoty kyseliny *cis* palmitoolejové



Graf 12: Hodnoty kyseliny *cis* palmitolejové - pokračování



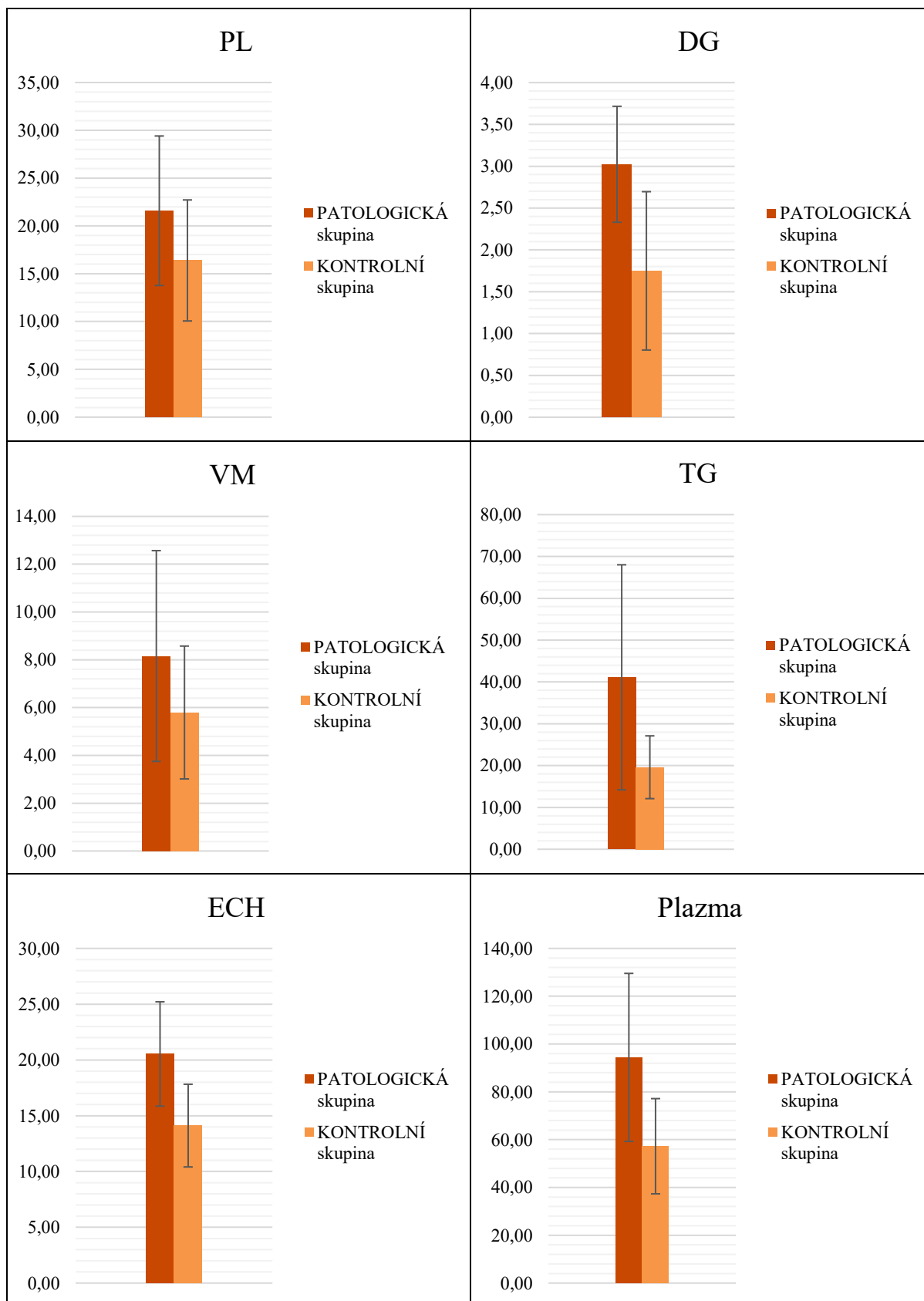
Graf 13: Statistika kyseliny *cis* palmitolejové



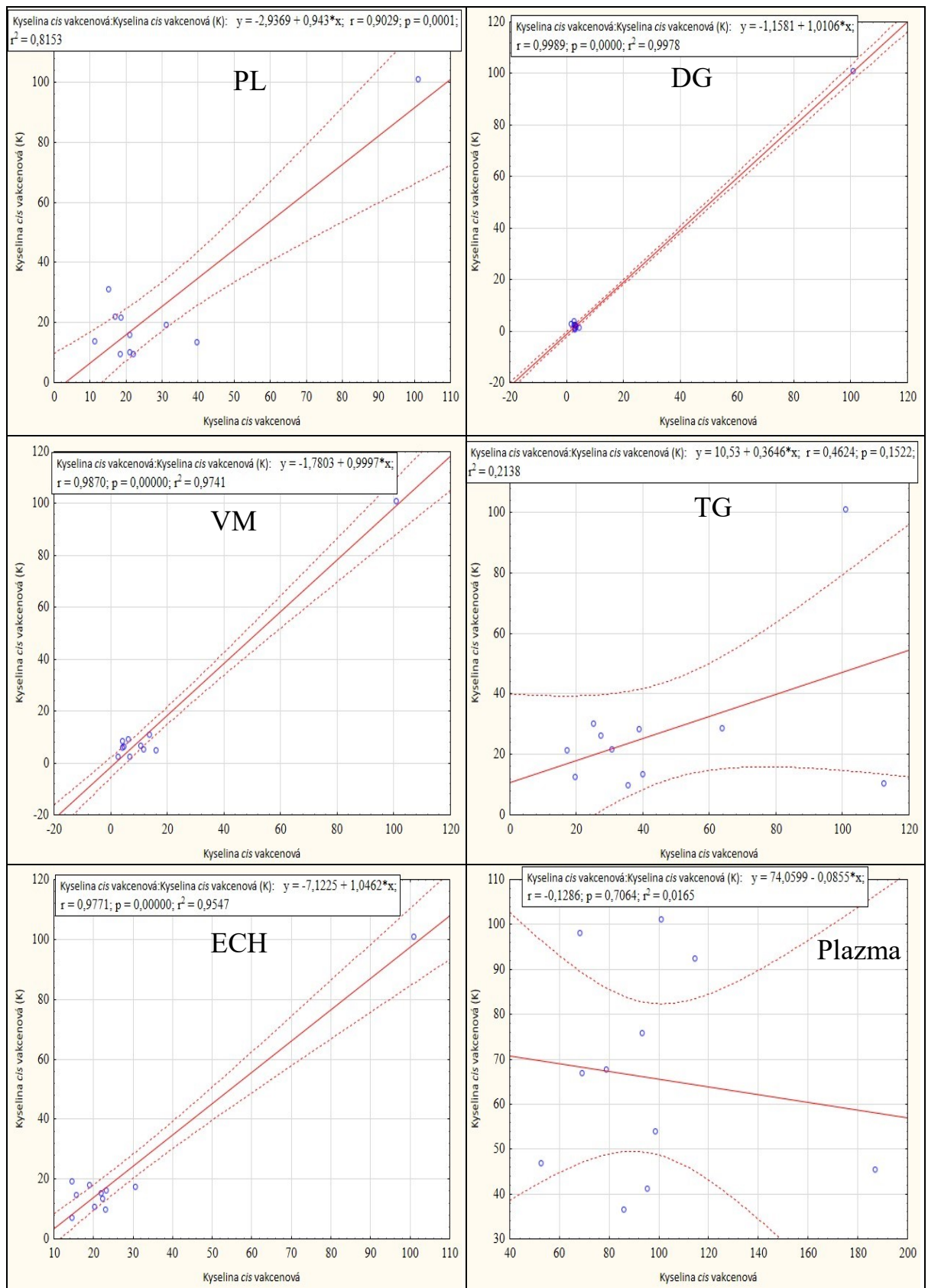
Graf 14: Statistika kyseliny *cis* palmitoolejové - pokračování

4.8 Kyselina *cis* vakcenová (18:1 n-7) a její hodnoty

Při porovnání naměřených dat kyseliny *cis* vakcenové výsledky ukázaly, že její koncentrace je signifikantně zvýšená u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti kontrolní skupině ve všech frakcích, kromě TG frakce viz. Graf 9 a Graf 10. Zvýšenou hodnotu koncentrace u patologické skupiny potvrzuje i celkové vyšší hodnota v plazmě pacientů s ALD viz. Graf 9 (Plazma), která ale není signifikantní viz Graf 10 (Plazma). Zdá se, že kyselina *cis* vakcenová se kumuluje převážně v TG frakci, tato změna však není statisticky významná viz. Graf 10 (TG), proto to nelze s určitostí zcela potvrdit. Také PL a ECH frakce ukazují zvýšené hodnoty viz. Graf 9 (PL, ECH).



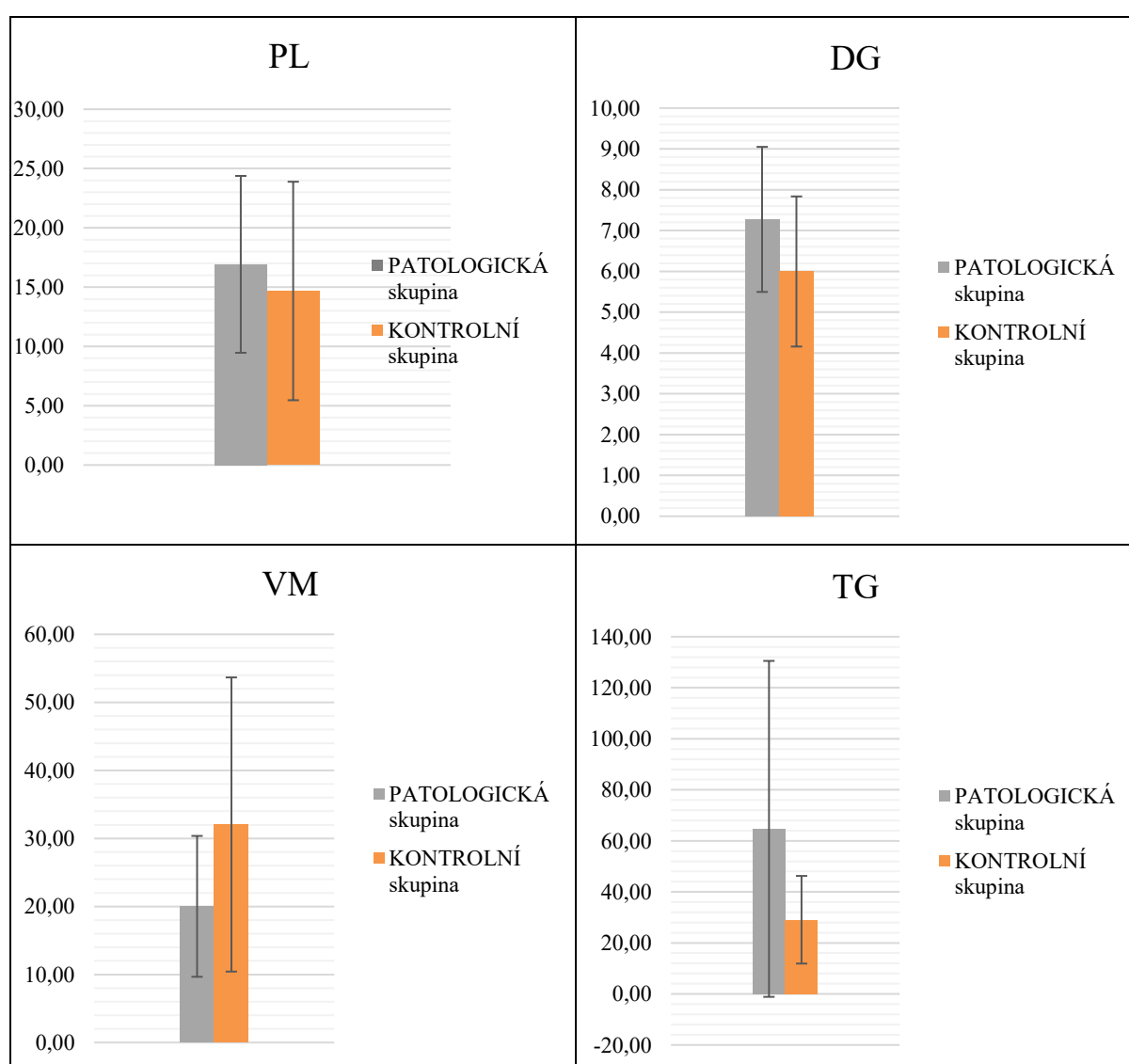
Graf 15: Hodnoty kyseliny *cis* vakcenové



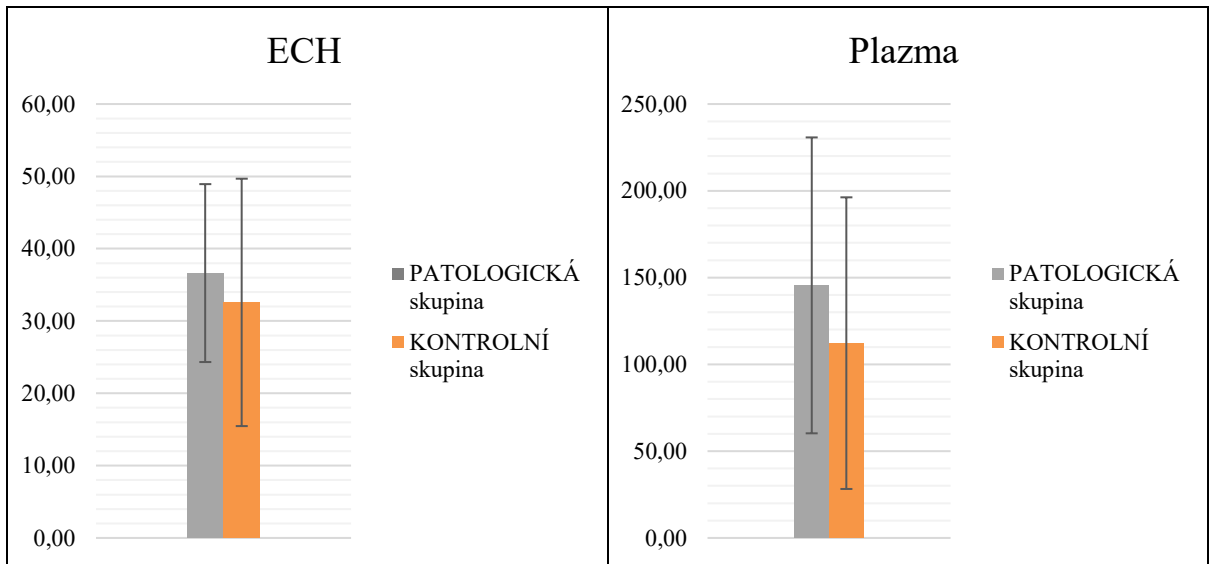
Graf 16: Statistika kyseliny *cis* vakcenové

4.9 Kyselina oktadekadienová (18:2 – 9Z, 11E) a její hodnoty

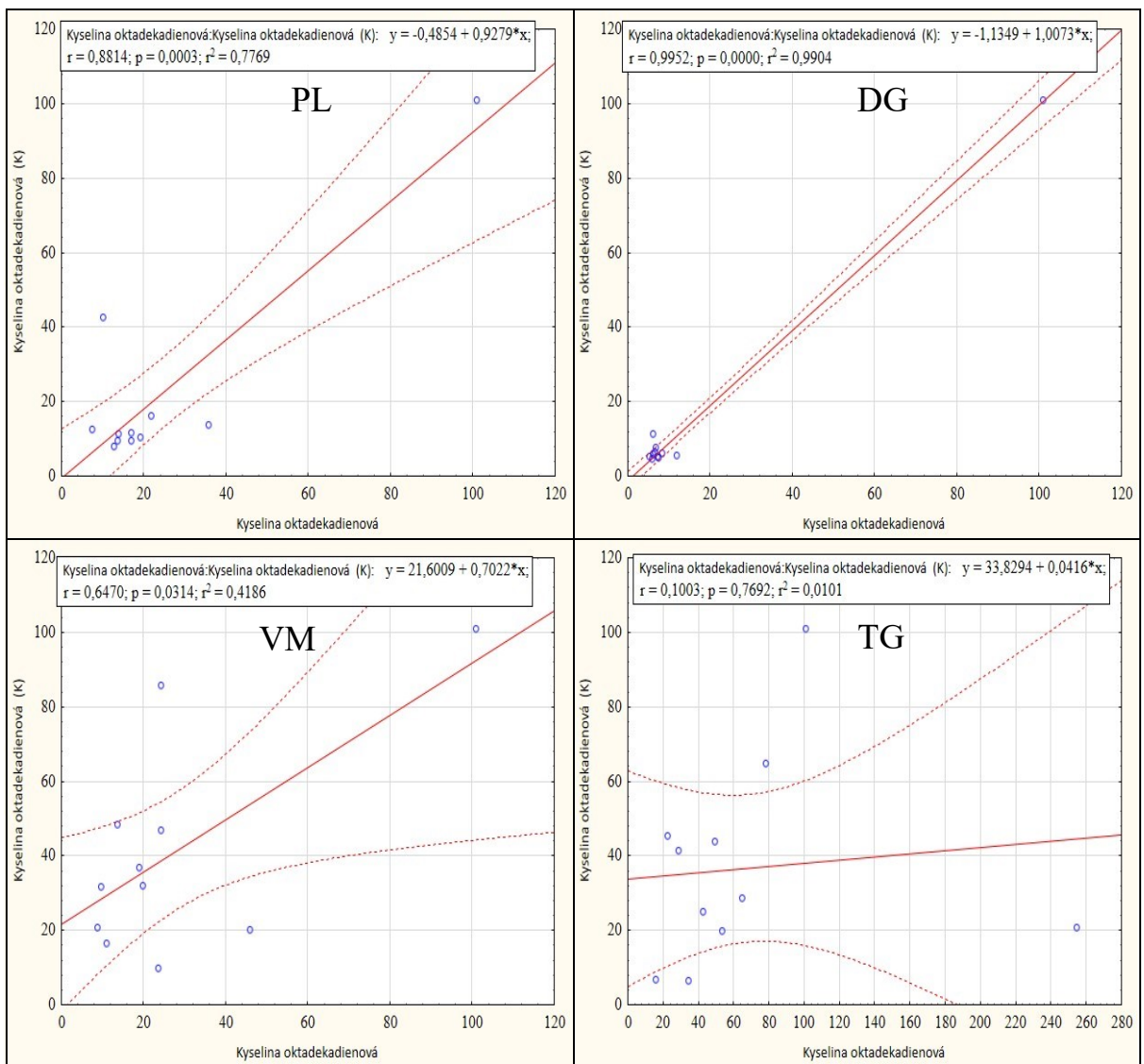
Porovnání získaných dat kyseliny oktadekadienové ukázalo, že její koncentrace vykazuje statisticky významně zvýšené hodnoty u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti zdravé kontrole ve frakcích PL, DG a ECH viz. Graf 11 a Graf 12. Ve frakci VM je její koncentrace naopak signifikantně snižena viz. Graf 11 a Graf 12. Zvýšená hodnota koncentrace u patologické skupiny se vyskytuje i v celkové plazmě pacientů s ALD, ale není však signifikantní viz. Graf 11 (Plazma) a Graf 12 (Plazma). Pravděpodobně se kyselina oktadekadienová kumuluje převážně v ECH a TG frakci, ovšem statisticky významně jen v ECH frakci viz. Graf 11 (TG, ECH) a Graf 12 (ECH). Nejnižší koncentrace se vyskytují v DG frakci viz. Graf 6 (DG).



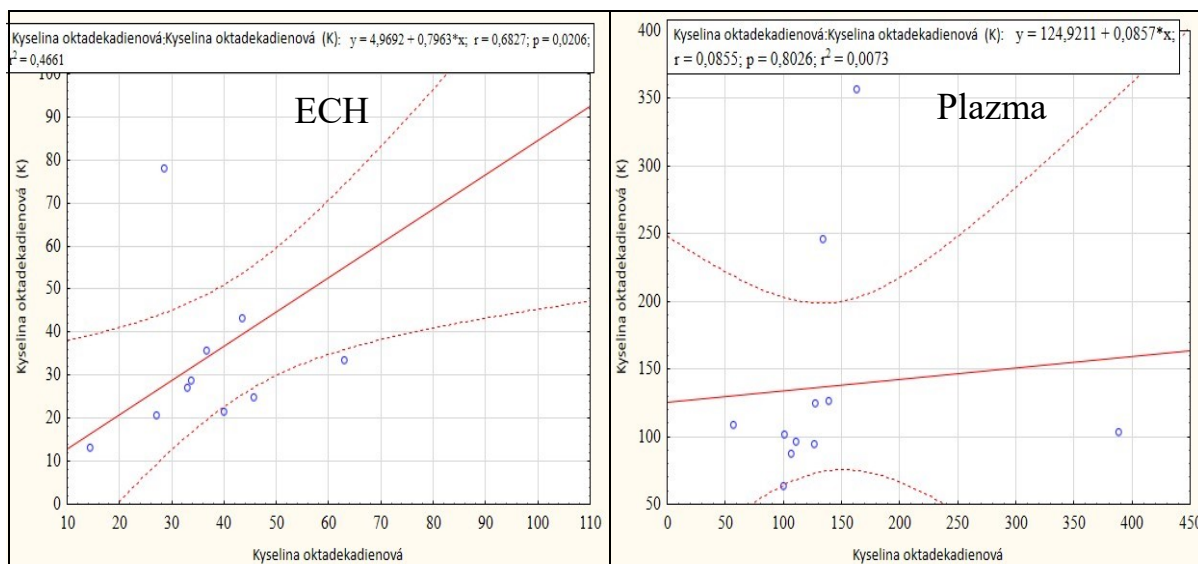
Graf 17: Hodnoty kyseliny oktadekadienové



Graf 18: Hodnoty kyseliny oktadekadienové - pokračování



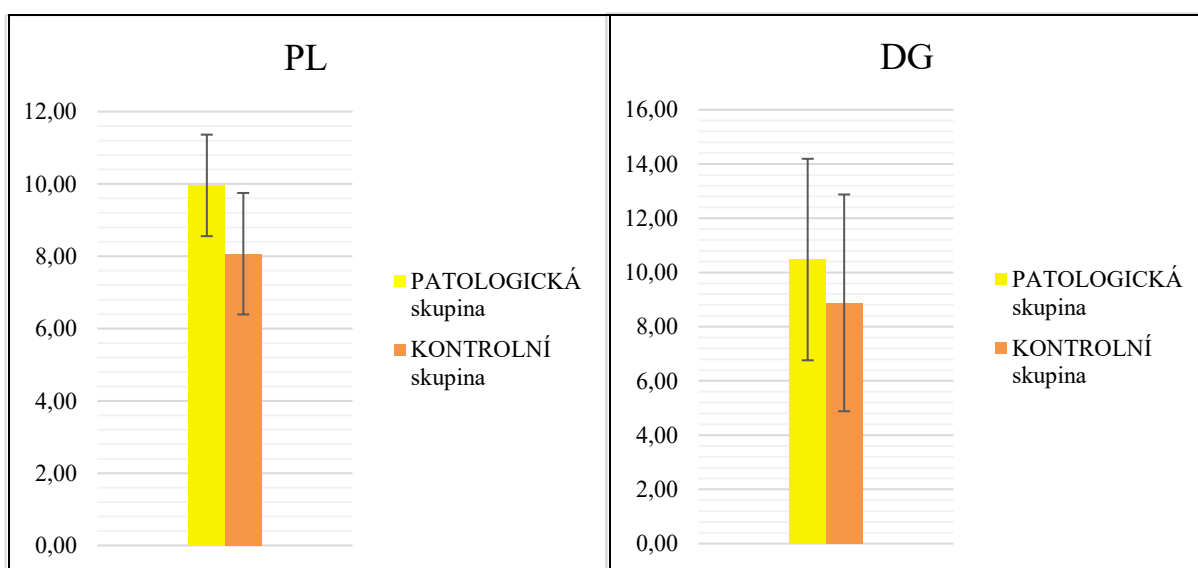
Graf 19: Statistika kyseliny oktadekadienové



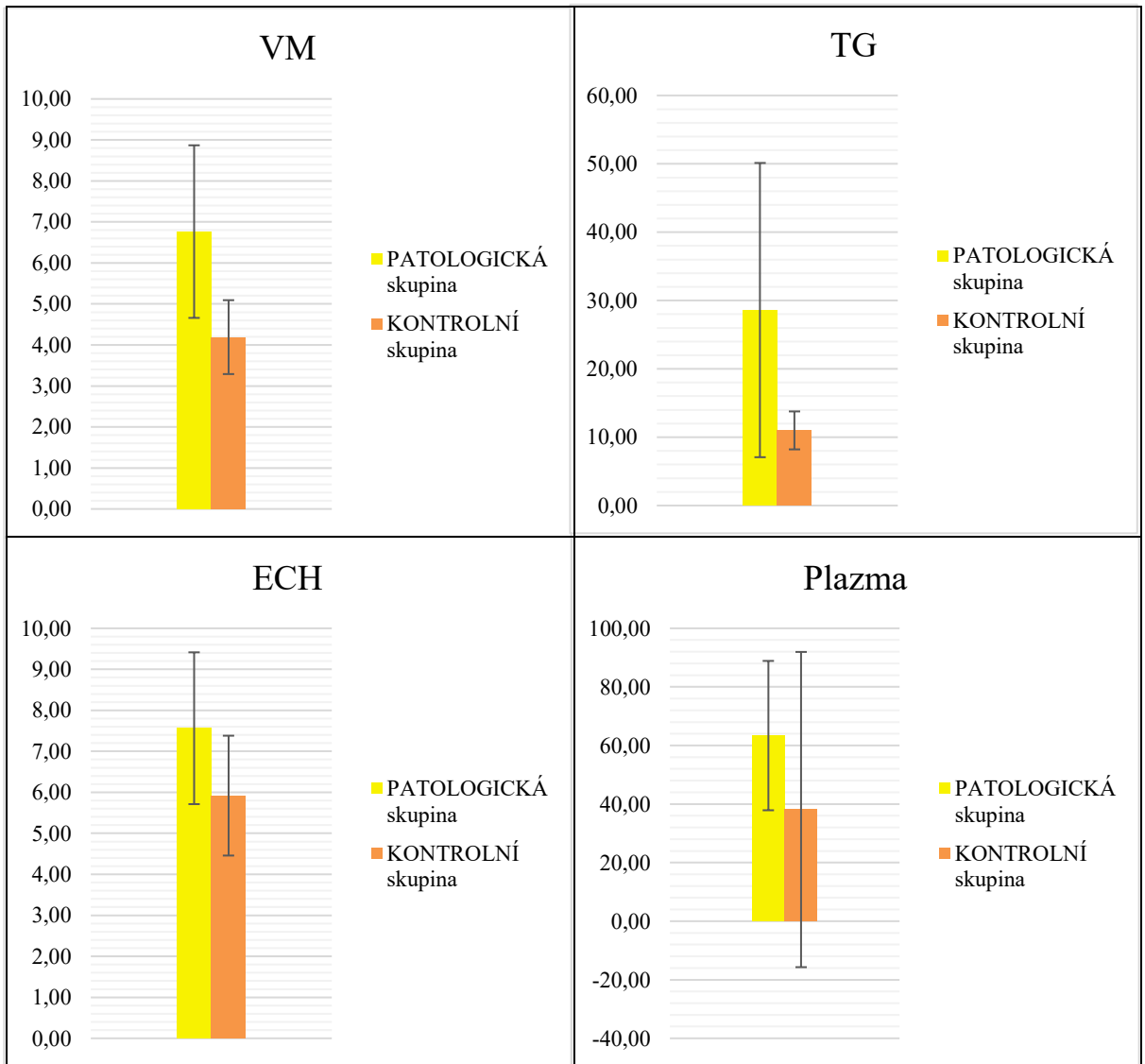
Graf 20: Statistika kyseliny oktadekadienové - pokračování

4.10 Kyselina oktadekadienová (18:2 – 10Z, 12Z) a její hodnoty

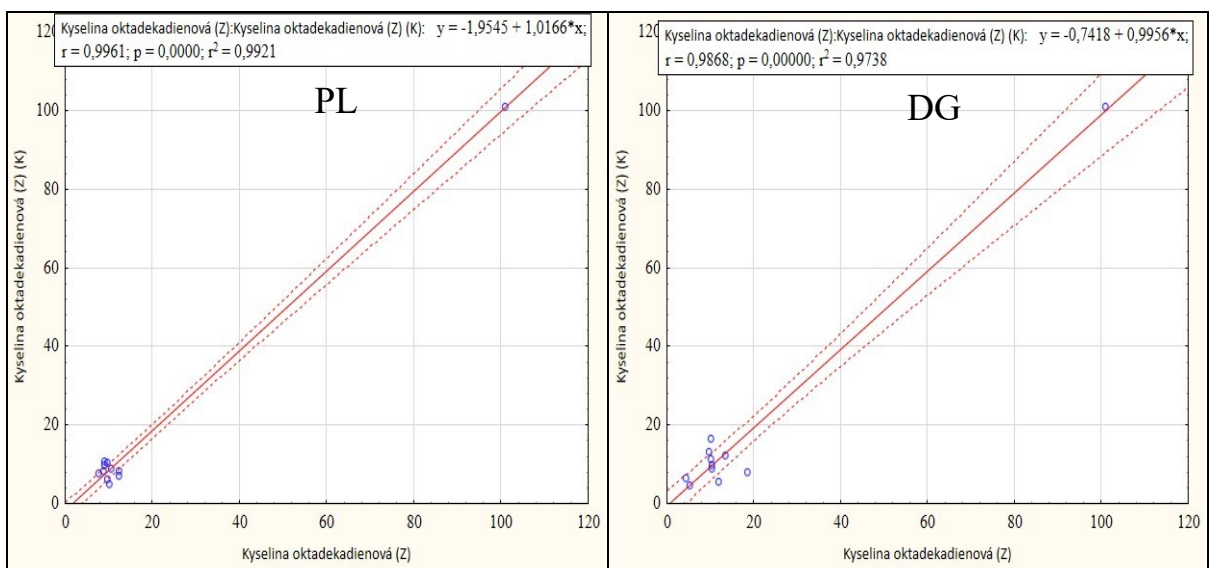
Zkoumání naměřených dat kyseliny oktadekadienové ukázalo, že její koncentrace je statisticky významně zvýšená u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti kontrolní skupině ve všech frakcích viz. Graf 13 a Graf 14. Zvýšená hodnota koncentrace kyseliny oktadekadienové u patologické skupiny se vyskytuje i v celkové plazmě, kde však tato hodnota není signifikantní viz. Graf 13 (Plazma) a Graf 14 (Plazma). Signifikantní výsledky naznačují, že kyselina oktadekadienová se kumuluje převážně v TG frakci viz. Graf 13 (TG) a Graf 14 (TG). Koncentrace v dalších frakcích je cca srovnatelná.



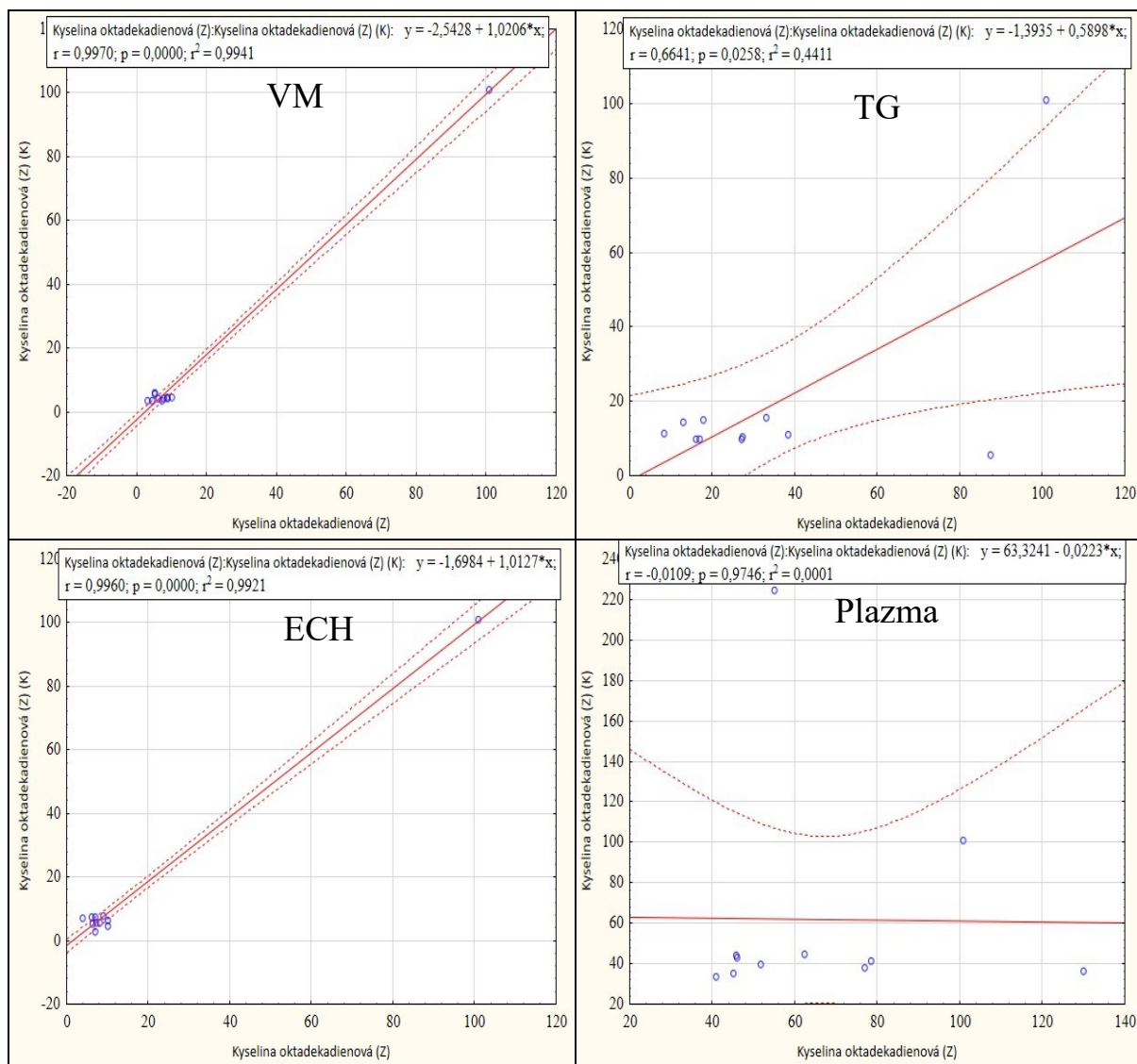
Graf 21: Hodnoty kyseliny oktadekadienové (Z)



Graf 22: Hodnoty kyseliny oktadekadienové (Z) - pokračování



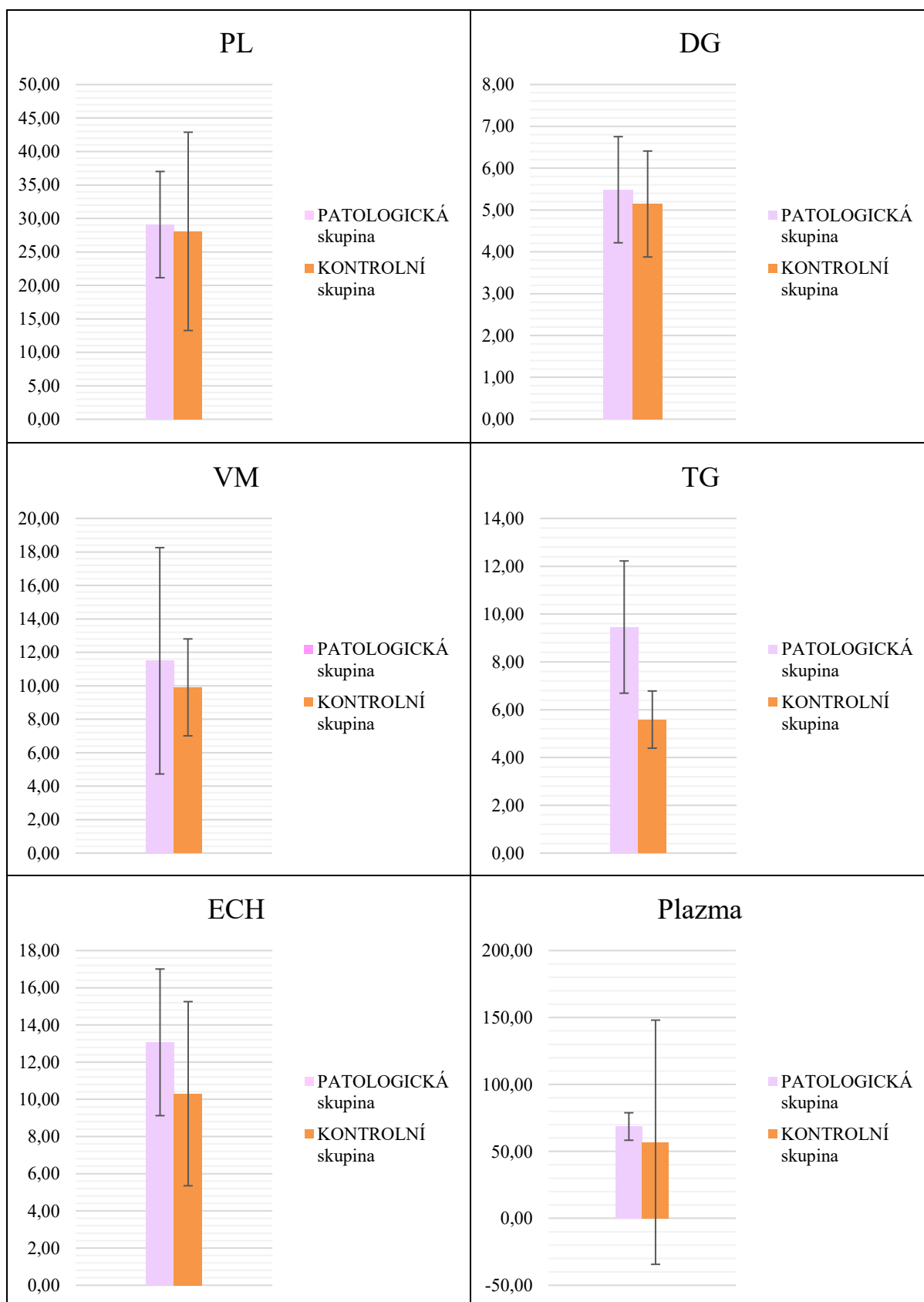
Graf 23: Statistika kyseliny oktadekadienové (Z)



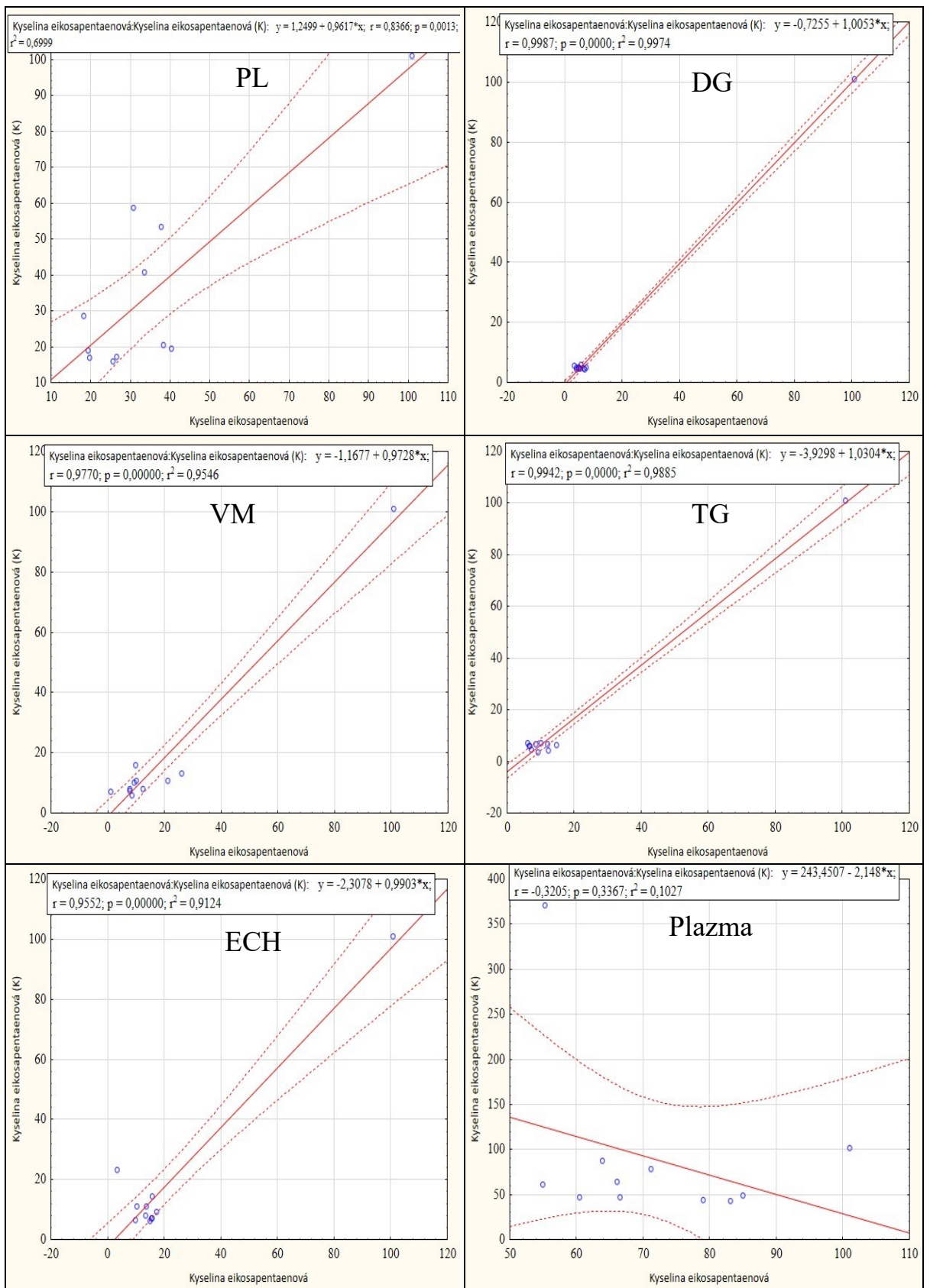
Graf 24: Statistika kyseliny oktadekadienové (Z) - pokračování

4.11 Kyselina eikosapentaenová (20:5 n-3) a její hodnoty

Výsledky získaných dat kyseliny eikosapentaenové poukazují na signifikantně zvýšené koncentrace u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti zdravé kontrole, a to ve všech frakcích viz. Graf 15 a Graf 16. Zvýšená hodnota koncentrace kyseliny eikosapentaenové u patologické skupiny je přítomná i v celkové plazmě, tato hodnota však není signifikantní viz. Graf 15 (Plazma) a Graf 16 (Plazma). Nejvyšší hodnotu koncentrace vykazuje PL frakce, naopak nejnižší hodnoty koncentrací se nacházejí v DG frakci viz. Graf 15.



Graf 25: Hodnoty kyseliny eikosapentaenové



Graf 26: Statistika kyseliny eikosapentaenové

5 DISKUZE

Předmětem diplomové práce bylo stanovení koncentrací vybraných tzv. minoritních mastných kyselin plazmy v izolovaných lipidových frakcích pacientů trpících adrenoleukodystrofií a porovnat je s hodnotami koncentrací kontrolních zdravých jedinců. Analýzy byly provedeny metodou plynové chromatografie. Konkrétně se jednalo o kyselinu myristovou (14:0), kyselinu pentadekanovou (15:0), kyselinu sapienovou (16:1 n-10), kyselinu *cis* palmitoolejovou (16:1 n-9), kyselinu *cis* akcenovou (18:1 n-7), kyselinu oktadekadienovou (18:2 – 9Z, 11E), kyselinu oktadekadienovou (18:2 – 10Z, 12Z) a kyselinu eikosapentaenovou (20:5 n-3). Snažila jsem se zjistit, zda by se i tyto mastné kyseliny daly použít jako další biochemické markery pro diagnostiku adrenoleukodystrofie.

Profil zastoupení mastných kyselin v jednotlivých tkáních je za fyziologických podmínek určen převážně geneticky. Je však ovlivňován dietními návyky jedince, působením hormonů a dalšími faktory, kterými může být např. infekce, přítomnost onemocnění nebo fyzikální vlivy prostředí. Tyto faktory ovlivňují aktivity enzymů jako jsou desaturázy a elongázy, které mají zásadní vliv na konečné složení obsahu mastných kyselin. Některá onemocnění mají charakteristický vliv na změnu složení profilu MK. Například zánět, oxidační stres a poruchy metabolismu jako je metabolický syndrom nebo *diabetes mellitus* 2. typu se většinou projevují zvýšeným obsahem nasycených mastných kyselin jako je zkoumaná kyselina myristová (14:0) a sníženým obsahem polynenasycených mastných kyselin. Pro metabolický syndrom je také typické zvýšené koncentrace kyseliny palmitoolejové, která je markerem liponeogeneze a byla také stanovována v této diplomové práci. Složení PUFA v plazmatických lipidech a buněčných membránách výrazně ovlivňuje biologické funkce buněk, orgánů až celého organismu. PUFA výrazně přispívají k fluiditě buněčným membránám a tím zasahují do funkce membránových proteinů jako jsou různé receptory, transportéry nebo enzymy. Změny ve složení MK mohou tedy ovlivňovat vnímavost organismu na různé patologické podněty. [41, 42]

Vybrané mastné kyseliny zatím nebyly v dřívějších studiích primárně zkoumány z hlediska adrenoleukodystrofie, ale byly stanovovány u různých dalších onemocněních jako jsou kardiovaskulární onemocnění, autoimunitní choroby nebo rakovinové zvraty.

Kyselina myristová, je nasycená mastná kyselina se 14 atomy uhlíku (14:0), která obvykle tvoří jen malou část (0,5 % až 1 %) z celkového obsahu mastných kyselin v živočišných tkáních. Proto její specifické vlastnosti a funkční role nebyly zatím plně prostudovány a popsány. Jedním z charakteristických znaků kyseliny myristové je její schopnost tzv. N-terminální

myristolace, která představuje schopnost kyseliny myristové kovalentně se vázat na N-terminální glycinový zbytek eukaryotických a virových proteinů. Prostřednictvím této reakce může kyselina myristová aktivovat mnoho fyziologických drah. Jednou z nich je schopnost regulace aktivity savčích desaturáz. Nedávné studie zjistily, že kyselina myristová působí jako aktivátor $\Delta 6$ desaturázy PUFA a samotná kyselina myristová je substrátem některých desaturáz mastných kyselin. Také působí jako regulátor desaturace dihydroceramidu na ceramid, který se vyskytuje v mozkové tkáni a hraje důležitou roli při metabolismu sfingolipidů. Společně s dalšími nasycenými MK je i ona spojována s negativními důsledky pro lidské zdraví. [42]

Kyselina myristová představuje zajímavý biomarker, který je možné použít v diagnostice různých chorob. Současné výzkumy se zaměřují na její stanovení u pacientů se syndromem systémové zánětlivé odpovědi a u pacientů v průběhu sepse. Také je využívána jako marker v souvislosti s kardiovaskulárními chorobami i s autoimunitními poruchami. [41, 42, 43, 44, 45, 46]

Ve studii [43] vyhodnocovali koncentrace kyseliny myristové, které byly zkoumány u septických pacientů a pacientů se syndromem systémové zánětlivé odpovědi pomocí GC/MS. Výsledky ukazovaly, že hladiny kyseliny myristové ve skupině pacientů v sepsi a skupině se syndromem systémové zánětlivé odpovědi byly významně vyšší ve srovnání se zdravými kontrolami. Výsledky této studie korelují s dalšími výzkumy, [41, 44] které se také zabývaly hladinami kyseliny myristové u septických pacientů. Ve studii [41] bylo objeveno, že signifikantnímu zvýšení kyseliny myristové u pacientů v sepsi bylo pozorováno především ve frakci esterů cholesterolu. Tento výsledek koreluje i s našim měřením u pacientů s adrenoleukodystrofií. Zvýšené hladiny kyseliny myristové také korelují se zvýšením plazmatického cholesterolu a úmrtností na kardiovaskulární onemocnění. Tímto tématem se zabývala studie, [45] kdy určovali mechanismy, kterými n-3 a n-6 PUFA mění markery zánětu a akumulace cholesterolu v makrofázích v porovnání s kyselinou myristovou. Výsledky studie poukazovaly na to, že makrofágy vystavené působení myristové mastné kyseliny vyvolaly významně vyšší zánětlivou reakci a kumulovaly v sobě větší množství cholesterolu než makrofágy ošetřené n-3 a n-6 PUFA. Zajímavé výsledky přinesl výzkum, [46] který se zabýval kyselinou myristovou z hlediska autoimunit, jako je revmatoidní artritida, zánětlivé onemocnění střev nebo RS. Autoimunitních onemocnění celosvětově přibývá a hromadí se údaje podporující klíčovou roli narušeného metabolismu. Výsledky naznačují, že metabolický profil sérových mastných kyselin je spojen s přítomností autoimunitních

onemocnění a může být doplňkovým nástrojem pro časnou diagnostiku. Mezi tyto MK patří i kyselina myristová, kdy její zvýšené koncentrace vypovídají o nedostatečné aktivitě $\Delta 9$ desaturázy, která je přímo spojená např. s inzulinovou rezistencí. [42]

Kyselina myristová se tedy jeví jako potenciální biomarker v diagnostice nejen sepse a kardiovaskulárních chorob, ale i adrenoleukodystrofie. A to z důvodů její zvýšené koncentrace při zánětlivé odpovědi, která se vyskytuje i u adrenoleukodystrofie, především pak v její cerebrální formě se zánětlivými ložisky v mozku. Také kvůli její roli v metabolismu lipidů a cholesterolu představuje kyselina myristová zajímavý ukazatel, který by bylo vhodné prozkoumat na vyšším počtu pacientů trpící adrenoleukodystrofií.

Kyselina pentadekanová (15:0) je nasycená mastná kyselina s lichým řetězcem, která se přirozeně vyskytuje v některých typech rostlin a ryb, mase přežvýkavců, a především v mléčné tuku savců. Důvod, proč se předpokládá, že kyselina pentadekanová pochází hlavně z mléčného tuku, je založen na tom, že tyto mastné kyseliny jsou produkovány v relativně vysokých hladinách mikrobiální fermentací. Nasycené mastné kyseliny s lichým řetězcem mají i svojí endogenní metabolickou dráhu. O jejím přesném fungování se stále diskutuje. V lidské tkáni se však vyskytuje v nízké koncentraci. Úloha kyseliny pentadekanové v lidském těle a její vliv na organismus byl v poslední době poměrně zkoumán. Dříve byly nasycené mastné kyseliny s lichým řetězcem používány především jako vnitřní standardy v metodách GC-MS a LC-MS pro stanovení celkových mastných kyselin. [47, 48]

Nyní se výzkumy zabývající kyselinu pentadekanovou zaměřují na její diagnostický význam, co by biomarkeru pro hodnocení dietního příjmu potravy, protože koncentrace kyseliny pentadekanové v krvi slouží jako ukazatel příjmu mléčného tuku. Dále se kyselina pentadekanová stanovuje jako biomarker pro riziko *diabetu mellitu* typu II a nealkoholického ztučnění jater. Určité studie se zaměřují na její terapeutický potenciál v léčbě rakoviny prsu. [47, 48, 49, 50, 51]

V rozsáhlé metaanalýze [49] vyhodnocovali koncentrace kyseliny pentadekanové, které byly zkoumány vzhledem k riziku vzniku *diabetu mellitu* 2. typu. Výsledky této analýzy ukazovaly, že vyšší hladiny této MK jsou spojeny s nižším rizikem rozvoje cukrovky druhého typu, a to nezávisle na hlavních rizikových faktorech, včetně věku, pohlaví, rasy atd. Závěry této metaanalýzy pozitivně korelovaly s výsledky výzkumu, [48] které také potvrdily, že zvýšené plazmatické koncentrace nasycených mastných kyselin s lichým řetězcem jsou spojeny s nižším

rizikem onemocnění, i když mechanismus tohoto účinku není zatím objasněn. Ve výzkumu [50] pro nealkoholického ztučnění jater identifikovali kyselinu pentadekanovou jako marker pro diagnostiku nealkoholické steatohepatitidy, kdy akumulace lipidů je ústředním rysem nealkoholického ztučnění jater. Výsledky naznačují, že nedostatek 15:0 přispívá k poškození jater u nealkoholické steatohepatitidy. Tudíž lze říct, že kyselina pentadekanová by mohla sloužit jako slibný biomarker poškození jater. Zajímavé terapeutické využití kyseliny pentadekanové přinesl výzkum, [47] jehož závěry podporuje i výzkum [51]. V těchto dvou studiích testovali vliv kyseliny pentadekanové v kombinaci s tamoxifenem na rakovinné buňky prsu s nízkou expresí estrogenového receptoru. Nedostatek nebo absence estrogenového receptoru v buňkách rakoviny prsu má za následek zvýšenou rezistenci na terapii. Prokázali, že kombinovaná léčba kyselinou pentadekanovou a tamoxifenem synergicky potlačuje růst rakovinových buněk lidského karcinomu prsu MCF-7, zároveň indukuje jejich apoptózu, a také tato kombinace indukuje reexpresi estrogenového receptoru. Celkově kyselina pentadekanová vykazuje potenciál zvýšit účinnost léčby rakoviny prsu s nedostatečnou expresí estrogenového receptoru.

Vzhledem k tomu, že koncentrace kyseliny pentadekanové je pravděpodobně primárně určována jejím příjmem v potravě, nejsem si jistá, zda je tato kyselina zcela vhodná jako diagnostický marker adrenoleukodystrofie. Naměřené výsledky vykazují snížené hodnoty koncentrací kyseliny pentadekanové u patologické skupiny téměř ve všech frakcích. Tyto trendy sice korelují s výzkumy, [48, 51] kdy snížená koncentrace kyseliny pentadekanové vykazují vyšší míru poškození určité tkáně, ale nejsem si jistá, jestli je tento biomarker zcela optimální pro diagnostiku ALD.

Kyselina sapienová, je mononenasyčená mastná kyselina (16:1 n-10), která je nejvíce obsažená v kůži a tvoří podstatnou součást lidského mazu, vlasů a nehtů. Předpokládalo se, že tato mastná kyselina souvisí pouze s kožním metabolismem a triglyceridy kožního mazu, kde vykazuje poměrně silnou antimikrobiální aktivitu. Nedávno však byla zjištěna její přítomnost v lidských lipoproteinech a plazmatických cholesterylesterech. Byla také nalezena v mnoha dalších lidských buňkách jako jsou erytrocyty a buňky vrozeného imunitního systému. Přítomnost kyseliny sapienové je v kůži dobře známá, ale i přes její přítomnost v oběhu není zatím dobře prozkoumána. Kyselina sapienová je syntetizována v mitochondriích a endoplasmatickém

retikulu desaturací kyseliny palmitové (16:0) prostřednictvím FADS2 působením $\Delta 6$ desaturázy. [52, 53, 54, 55]

Kyselina sapienová a další hexadekanové mononenasyčené mastné kyseliny mezi, které patří i kyselina palmitoolejová, jsou stále více považovány za biomarkery zdravotního stavu s klíčovými funkcemi ve fyziologii a patofyziologii. Současné výzkumy se zaměřují na metabolická onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, nealkoholické ztučnění jater a rakovinu. Studie o biologických účincích kyseliny sapienové jsou stále vzácné, ale hromadící se důkazy naznačují, že také hraje důležitou roli v metabolické regulaci. [52, 55]

Ve studii [52] detekovali zvýšené množství kyseliny sapienové v membránách (PL frakci) cirkulujících červených krvinek u morbidně obézních jedinců. V TG a ECH frakci neutrálních lipidů byla však její hodnota snížena. Naše výsledky jsou však lehce v rozporu, protože ukazují její zvýšené koncentrace ve všech frakcích. Výzkumy kyseliny sapienové se také ubírají směrem k diagnostice rakoviny. Většina nádorů má pozměněný metabolismus lipidů, který jim umožňuje přeměňovat mastné kyseliny pro podporu proliferace. Studie [56] se zabývala působením kyseliny sapienové v lidských rakovinových buňkách a zkoumala její dopad na membrány, membránové receptory a buněčnou signalizaci. Stejným tématem se zabývala i studie [57] u primárních lidských karcinomů jater a plic. Zde objevili, že rakovinové buňky přeměňují více palmitátu na kyselinu sapienovou, čímž podporují biosyntézu membrán během jejich proliferace a tvorby metastáz. Kyselina sapienová se tedy jeví jako potenciální biomarker v diagnostice tumorových zvrátů.

Vlivy koncentrací kyseliny sapienové zatím nejsou zcela prostudovány ve fyziologických vzorcích, natož v patologických. Jeví se ale jako slibný diagnostický marker, který by bylo vhodné dále a podrobněji studovat. Mohla by být i zajímavým markerem u ALD, protože v našem pokusu byla její koncentrace zvýšena ve všech frakcích.

Kyselina *cis* palmitoolejová, je mononenasyčená mastná kyselina (16:1 n-7), která je běžnou součástí glycerolů v lidských lipidech a vyskytuje se ve všech tkáních, nejvíce pak v játrech. Je spojována s protizánětlivými procesy prostřednictvím specifických proteinových interakcí. Vliv kyseliny *cis* palmitoolejové je také pozitivně spojována s krevním tlakem, zánětem a inzulinovou rezistencí. Kyselina palmitoolejová je syntetizována v endoplasmatickém retikulu desaturací kyseliny palmitové (16:0) působením $\Delta 9$ desaturázy. [52, 58, 59]

Kyselina palmitoolejová a další hexadekanové mononenasyčené mastné kyseliny, mezi které patří i kyselina sapienová, jsou čím dál více považovány za biomarkery vypovídající o zdravotním stavu. Protože je kyselina *cis* palmitoolejová obsažena v tkáních poměrně ve vysoké koncentraci, je proto nejvíc studována. Tato kyselina byla popsána jako lipokin, který je schopný regulovat četné metabolické procesy, jako je zvýšení citlivosti na inzulín nebo podpora proliferace β -buněk slinivky. Kyselině *cis* palmitoolejové jsou připisovány četné příznivé účinky, i když její přesná funkce na lidském organismu také ještě není zcela pochopena. Studie se zaměřují na metabolická onemocnění, jako hypercholesterolemie, ateroskleróza, jaterní steatóza a sepse. [41, 52, 60]

Ve studii [52] detekovali zvýšené množství kyseliny *cis* palmitoolejové v membránách (PL frakci) cirkulujících erytrocytů u morbidně obézních jedinců, tak i v plazmatické ECH frakci. Tento výsledek je opačný v porovnání s kyselinou sapienovou, která byla stanovována ve stejné studii. Naše výsledky pro ALD ovšem vykazují zvýšené hladiny kyseliny *cis* palmitoolejové ve všech frakcích. Studie [41] stanovovala koncentrace MK u septických pacientů z odebrané plazmy. Výsledky ukazovaly na signifikantní zvýšení *cis* palmitoolejové v PL, TG a ECH frakci. Tento výsledek koreluje i s našim měřením u pacientů s adrenoleukodystrofií. Studie [58] hodnotila, zda suplementace kyselinou *cis* palmitoolejovou může zlepšovat průběh ulcerózní kolitidy a výzkum [60] se zabýval působením kyseliny *cis* a *trans* palmitoolejové na potlačení hypercholesterolemie a jaterní steatózy. Výsledky ukázaly, že *cis* palmitoolejová neměla až takový vliv na snížení sérového a volného cholesterolu v játrech jako izomer *trans*. Ale po provedení histologického vyšetření jater bylo odhaleno, že *cis* izomer zlepšuje jaterní steatózu účinněji než *trans* izomer.

Výsledky studií ukazují, že koncentrace kyseliny *cis* palmitoolejové je zvýšená při zánětlivých procesech a její další podání působí v určitých případech protizánětlivě. Kyselina *cis* palmitoolejová by teoreticky mohla být určitým způsobem podpurným markerem adrenoleukodystrofie. A to z důvodu její zvýšené koncentrace při zánětlivé reakci, která se vyskytuje i u adrenoleukodystrofie, především pak v její cerebrální formě se zánětlivými ložisky v mozku. Také kvůli její roli v metabolismu lipidů a cholesterolu představuje kyselina *cis* palmitoolejová zajímavý ukazatel. Bylo by však potřeba provést rozsáhlé analýzy na vyšším počtu pacientů trpících adrenoleukodystrofií.

Kyselina *cis* vakcenová (18:1 n-7 *cis*) je mononenasyčená mastná kyselina a neesenciální stereoisomer kyseliny *trans* vakcenové. Vyskytuje se především ve střevech a mléce. Je spojována s pozitivními účinky na zdraví. Jedním z důvodů je, že se předpokládá její inhibiční vliv na tvorbu novotvarů. [61] Také proto, že její zvýšené koncentrace zřejmě snižuje rizika pro vznik srdečního selhání, jak potvrzuje výzkum. [59, 62]

Studie zaměřené na tuto mastnou kyselinu v souvislosti s patologií je velmi málo. Studie [61] pozorovala vliv kyseliny *cis* vakcenové v souvislosti s funkcí ledvin. Je zajímavé, že snížené hladiny kyseliny *cis* vakcenové vykazovaly spojitost se sníženou glomerulární filtrací pouze u některých etnických skupin. Jedním z dalších výzkumů je [63] je studie, ve které se zaměřili na gestační *diabetes mellitus*, kdy hodnotili složení plazmatických PL frakcí mezi případy gestačního *diabetu* a zdravými kontrolami. Výsledky ukazovaly že, nárůst kyseliny *cis*-vakcenové se vyskytoval u pacientů s gestačním *diabetem* oproti zdravé skupině. U septických pacientů ve studii [41] výsledky ukazovaly na signifikantní zvýšení MUFA, mezi které patří i *cis* vakcenová kyselina, v PL, TG a ECH frakci. Naše zkoumání kyseliny *cis* vakcenové sice koreluje s výzkumem [41], ale protože byl výzkum zaměřen na MUFA, a ne přímo na kyselinu *cis* vakcenovou, nelze tvrdit, že by tato studie zcela podporovala náš výsledek.

U kyseliny *cis* vakcenové nedokážeme s určitostí říct, zda by byla vhodným nebo nevhodným markerem ALD. Vzhledem k tomu, že výzkumy její role v patologických stavech jsou omezené, nemám dostatek informací k adekvátnímu posouzení. Uvidí se, zda se touto MK budou vědci dále zabývat.

Kyselina oktadekadienová (18:2 -9Z, 11E) je jedním z polohových izomerů kyseliny linolové s konjugovanými dvojnými vazbami. Tento izomer je v přírodě nejhojnější a triviálním názvem se označuje jako kyseliny rumenová. Vzniká desaturací kyseliny *trans* vakcenové působením $\Delta 9$ desaturázi nebo působením anaerobních bakterií v bachoru přežvýkavců. Vyskytuje se především v mléčných výrobcích a mase přežvýkavců. Lze ji i syntetizovat uměle zahříváním kyseliny linolové v přítomnosti alkalických roztoků. Je známo, že kyselina rumenová se běžně nachází v lidské plazmě jako součást triglyceridů, fosfolipidů a esterů cholesterolu. Existuje však málo údajů o její normální koncentraci v lidské plazmě. Její fyziologickou koncentrací se zabýval výzkum [64], který navrhl spodní mez obsahu kyseliny rumenové v plazmě na cca 0,1 % celkových mastných kyselin. [64, 65, 66]

Tato kyselina vykazuje řadu zdravotních přínosů pro lidský organismus. Jedním z nich je schopnost kyseliny rumenové působit na tumorově zvrhlé buňky. Studie této mastné kyseliny se proto primárně ubírají tímto směrem. Byl zjištěn cytostatický a cytotoxický vliv této MK u velké škály druhů rakovin, jako jsou např. nádory mléčné žlázy, hepatom, maligní melanom, kolorektální karcinom nebo karcinom žaludku. Dále se výzkumy zabývají jejím vlivem při kolitidě nebo jejím vlivem na myosin ve svalech. [65, 66]

Studie [65] zkoumala schopnost kyseliny rumenové a dalších izomerů konjugované kyseliny linolové na rakovinu prsu. Výsledky ukazovaly na schopnost kyseliny rumenové snížit proliferační aktivitu premaligních buněk mléčné žlázy. Další výzkum [66] se zabýval vlivem kyseliny rumenové na buňky karcinomu žaludku a její možný mechanismus prevence metastáz. Studie [67] zabývající se vlivem kyseliny rumenové při průběhu kolitidy přinesla výsledky, že kyselina rumenová vykazuje zlepšenou ochranu střev proti kolitidě. Zjišťování vlivu kyseliny rumenové na svalové buňky, především na myozin, se zabývaly výzkumy. [68, 69] Kdy zjistili, že tato mastná kyselina zvyšuje rychlost uvolňování ortofosfátu a zvyšuje schopnost srdečního svalu reagovat na vápenaté ionty. Této schopnosti by se dalo využít při poruchách především srdečního svalu.

Naše výsledky kyseliny oktadekadienové (18:2 -9Z, 11E) vykazují zvýšené hodnoty u pacientů s adrenoleukodystrofií, a to především ve ECH a TG frakci, což sice koreluje s jejím přirozeným výskytem v těchto frakcích, ale není nijak signifikantní ve spojitosti s ALD. Vzhledem k tomu, že koncentrace kyseliny rumenové může kolísat vzhledem k jejímu příjmu v potravě, nejsem si tedy jista, zda je tato kyselina zcela vhodná jako diagnostický marker adrenoleukodystrofie. Tato MK je velice zajímavá vzhledem k jejímu účinku na tumorové buňky proto bude asi v budoucnosti ještě více testována na účinnost této vlastnosti.

Kyselina oktadekadienová (18:2 -10Z, 12Z) je jedním z dalších polohových izomerů konjugované kyseliny linolové. Tento izomer je v přírodě druhý nejhojnější. Stejně jako izomer (18:2 -9Z, 11E) vzniká desaturací kyseliny *trans* vakcenové nebo působením anaerobních bakterií v bachoru přežvýkavců, a proto se vyskytuje především v mléčných výrobcích a mase přežvýkavců. Účinky přímo tohoto izomeru nejsou zcela známy, ve valné většině studií se zkoumá dohromady s dalšími izomery konjugované kyseliny linolové. Proto se i u této MK předpokládá účinný vliv na různé rakovinové buňky, jak potvrzují výzkumy. [64, 65, 66] Další studie [70] se zabývala těmito izomery z pohledu jejich účinnosti na zánětlivé cytokiny

a adipokiny. Výsledky ukázaly, že suplementace izomery konjugované kyseliny linolové, zvyšují koncentraci CRP, snižují hodnoty IL-6 a TNF- α , ale nemá žádný vliv na hladiny adiponektinu a leptinu.

Výsledky mé práce u kyseliny oktadekadienové (18:2 -10Z, 12Z) vykazují zvýšené hodnoty u pacientů s adrenoleukodystrofií ve všech frakcích. Když přihlédneme k tomu, že koncentrace této kyseliny může v organismu kolísat vzhledem k jejímu příjmu v potravě, nejsem si jista, zda je tato kyselina zcela vhodná jako diagnostický marker ALD. Izomery konjugované kyseliny linolové jsou velice zajímavé látky s velkým potenciálem, který by bylo vhodné dále pečlivě studovat.

Kyselina eikosapentaenová (20:5 n-3) je polynenasycená mastná kyselina s dlouhým řetězcem se všemi *cis* dvojnými vazbami. Kyselina eikosapentaenová vzniká z kyseliny linolenové procesem desaturace a elongace především v endoplazmatickém retikulu jaterních buněk. Ve vysoké míře je obsažena v nervové tkáni a retině, kde zajišťuje funkci buněčné signalizace. Je jedním z důležitých prekurzorů prostaglandinů a tromboxanů. Přírodně se nachází hlavně v rybím oleji. Této mastné kyselině je připisováno množství zdravotně pozitivních účinků. Připisuje se jí protizánětlivý a proti rakovinový účinek. Během zánětu je kyselina eikosapentaenová metabolizována cyklooxygenázami a lipoxygenázami za vzniku eikosanoidů. Eikosanoidy odvozené od této kyseliny jsou však méně účinnými induktory zánětu a tvorby trombů než eikosanoidy odvozené od kyseliny arachidonové. [2, 71]

Studie této mastné kyseliny se zaměřují především na její účinek při ateroskleróze. Výzkum [71] zkoumal její účinek na kalcifikaci tepen *in vitro* a *in vivo* v kombinaci se statiny. Výsledky ukazují, že kyselina eikosapentaenová potlačuje kalcifikaci tepen prostřednictvím suprese zánětlivých reakcí, oxidačního stresu a Wnt signalizace. Statiny zároveň snižují hladinu LDL cholesterolu. Dosud však chybí důkazy prokazující účinek EPA na kalcifikaci tepen v klinické praxi. Jedním z důvodů je určení optimální indikované dávky kyseliny eikosapentaenové v klinické praxi. Další studie zabývající se tímto tématem jsou [71, 72]. Výzkum [73] se zabýval účinností stabilního ethylesteru kyseliny eikosapentaenové. Při jeho použití bylo zjištěno, že vykazuje schopnost snižovat koncentraci lipidů, zmírňuje zánět v aterosklerotickém plaku a snižuje akumulaci makrofágů. Což významně vede ke snížení kardiovaskulárních příhod. Ke stejným závěrům dospěla i studie [72]. Studium eikosapentaenové kyseliny se dále zaměřuje

na její proti rakovinový vliv. Kdy ve výzkumu [74] potvrdili její proapoptotickou schopnost u určitých rakovinových buněk mléčné žlázy. Stanovení této MK jako biomarkeru různých karcinomů plic se zabývala studie [75]. Kdy hodnoty koncentrací kyseliny eikosapentaenové jsou specifické pro spinocelulární karcinom plic. Touto MK se zabývala studie [76] v souvislosti se Zellwegerovým syndromem a X-ALD. Kdy zkoumali retrokonverzi kyseliny dokosahexaenové (22:6 n-3) na kyselinu eikosapentaenovou ve fibroblastech se syndromem a adrenoleukodystrofií. Zjistili, že tato přeměna je deficitní při Zellwegovém syndromu, ale normální u ALD. Což ukazuje na to, že peroxizomální lignoceril-CoA ligáza pravděpodobně není nutná pro aktivaci kyseliny dokosahexaenové.

Výsledky eikosapentaenové kyseliny (20:5 n-3) vykazují zvýšené hodnoty u pacientů s adrenoleukodystrofií, a to ve všech frakcích. Nejvyšší hodnota se ovšem nachází v PL frakci. Kyselina eikosapentaenová by mohla představovat zajímavý biomarker adrenoleukodystrofie, vzhledem k její roli v metabolismu lipidů a cholesterolu. Bylo by však potřeba provést její stanovení na větším množství pacientů trpící ALD.

6 ZÁVĚR

V diplomové práci jsem se zabývala biochemickými markery adrenoleukodystrofie přítomnými v plazmě těchto pacientů. Bylo zpracováno deset vzorků plazmy od pacientů trpících adrenoleukodystrofií v různém stádiu onemocnění a jedenáct vzorků plazmy zdravých jedinců. Analýza byla nejprve provedena metodou tenkovrstvé chromatografie, díky které se mastné kyseliny rozdělily do pěti lipidových frakcí. Následně byla provedena derivatizace mastných kyselin na methylestery a jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Naměřená data byla dále zpracovávána pomocí Microsoft Office Excel a Statistica 14.

Cílem práce bylo stanovit koncentrace vybraných mastných kyselin plazmy v izolovaných lipidových frakcích pacientů trpících adrenoleukodystrofií a porovnat jednotlivé naměřené koncentrace s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Analýza byla následně zaměřena na tzv. minoritní mastné kyseliny, u kterých byla snaha zjistit, zda by se i tyto mastné kyseliny daly použít jako další či podpůrný biochemický marker adrenoleukodystrofie, k již zavedené biochemické praxi.

Vybrala jsem osm minoritních mastných kyselin, u kterých jsem prokázala rozdílné koncentrace mezi skupinou nemocných a zdravou kontrolní skupinou. Jednalo se o kyselinu myristovou, pentadekanovou, sapienovou, *cis* palmitoolejovou, *cis* vakcenovou, oktedekadienová (18:2 – 9Z, 11E), oktedekadienová (18:2 – 10Z, 12Z) a eikosapentaenovou. Tyto mastné kyseliny byly popsány a v souvislosti s dostupnou literaturou zhodnoceny, zda by představovaly potenciální biomarkery ALD.

Kyselina myristová, *cis* palmitoolejová a eikosapentaenová působí jako slibné podpůrné biomarkery adrenoleukodystrofie. Především z důvodů, že jejich koncentrace se zvyšuje u zánětlivé odpovědi organismu, která se vyskytuje i u ALD, především pak v cerebrální formě, což koreluje s mými výsledky. Dále také vzhledem k jejich rolím v metabolismu lipidů a cholesterolu. Tyto mastné kyseliny by bylo vhodné otestovat na větším množství subjektů, aby se tento předpoklad ověřil. U kyseliny pentadekanové, sapienové a *cis* vakcenové si nejsem jistá, zda by byly vhodné jako biomarkery ALD. V případě kyseliny pentadekanové můj výsledek snížené koncentrace u patologické skupiny sice koreluje s informací, že její snížená koncentrace poukazuje na poškození tkáně, ale kvůli tomu, že její koncentrace může kolísat vzhledem ke složení potravy, není tento marker úplně spolehlivý. U kyseliny sapienové a *cis* vakcenové nemáme dostatek informací k jejich adekvátnímu posouzení. Všeobecně jsou

výzkumy těchto MK ojedinělé a stále není zcela známa jejich funkce ve fyziologii, natož v patologii určitých onemocnění. Naše výsledky však ukazují zvýšené hodnoty u pacientů s adrenoleukodystrofií oproti zdravé kontrole. Bylo by zajímavé se těmto MK v budoucnu dále věnovat a zjistit jejich funkce a vlastnosti v lidském organismu. Konjugáty kyseliny linolové, mezi které patří kyselina oktedekadienová (18:2 – 9Z, 11E) a oktedekadienová (18:2 – 10Z, 12Z) se příliš nejeví jako potencionální markery adrenoleukodystrofie. Jejich koncentrace může výrazně kolísat vzhledem k jejich příjmu v potravě, proto nepředstavují stabilní biochemický marker. Výzkumy těchto MK se především ubírají směrem k jejich schopnosti potlačovat rakovinové zvraty, kde se jeví jako slibné terapeutikum. Mé výsledky rovněž poukázaly na to, že jednotlivé mastné kyseliny je třeba stanovovat v jednotlivých rozdělených frakcích, protože při statistickém vyhodnocení celkové hodnoty koncentrace mastných kyselin v plazmě, nebyla pozorována žádná signifikantní změna nemocných oproti kontrolním jedincům. Tudíž stanovení MK jen z celkové plazmy není pro analýzu zcela vhodné.

Pro jednoznačné závěry, zda by se tyto stanovované mastné kyseliny daly určitým způsobem využít u diagnostiky adrenoleukodystrofie, je potřeba dalších rozsáhlejších studií na postižených jedincích. Výzkumy biomarkerů pro adrenoleukodystrofií jsou všeobecně ztíženy kvůli různým stádiím tohoto onemocnění, nekorelaci genotyp-fenotyp, rozdílným projevům u mužů a žen i z důvodů, že toto onemocnění není v populaci až tak časté.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KOOLMAN J, KLAUS-HEINRICH R. *Barevný atlas biochemie*. 4. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [2] TVRZICKÁ E., STAŇKOVÁ B., VECKA M., ŽÁK A. Mastné kyseliny 1. Výskyt a biologický význam. *Časopis lékařů českých* [online]. **2009**(1), 16-24.
- [3] TVRZICKÁ E., STAŇKOVÁ B., VECKA M., ŽÁK A. Mastné kyseliny 2. Fyziologický a klinický význam. *Časopis lékařů českých* [online]. **2009**(3), 116-123.
- [4] KEMP S., BERGER J., AUBOURG P. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1822(9), 1465-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.03.012.
- [5] *Vybrané kapitoly z obecné biochemie, klinické biochemie a pathobiochemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2015. ISBN 978-80-7395964-7.
- [6] *Základní biochemické dráhy v buňce*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-0819-7.
- [7] INSTITUT GALENUS. Peroxizomy. *Institut Galenus* [online]. Copyright 2008. 2023. <https://www.galenus.cz/clanky/bunka-a-tkane/biochemie-bunka-peroxizomy>
- [8] MEDLINEPLUS GENETICS. X-linked adrenoleukodystrophy. *MedlinePlus – Health Information from the National Library of Medicine* [online]. Copyright 2010 Terese Winslow LLC for National Cancer Institute. **2022**. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/x-linked-adrenoleukodystrophy/>
- [9] ENGELEN, M., KEMP, S. & POLL-THE, BT. X-Linked Adrenoleukodystrophy: Pathogenesis and Treatment. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **14**, 486 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11910-014-0486-0>
- [10] BERGER J., FORSS-PETTER S., EICHLER F.S. Pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimie* [online]. 2014, **2014**(98), 135-142. doi: 10.1016/j.biochi.2013.11.023.
- [11] HONEY M., JASPERS Y., ENGELEN M, KEMP S, HUFFNAGEL IC. Molecular Biomarkers for Adrenoleukodystrophy: An Unmet Need. *Cells*. 2021 Dec 6;10(12), 3427. doi: 10.3390/cells10123427.

- [12] TURK BR., THEDA C., FATEMI A., MOSER AB. X-linked adrenoleukodystrophy: Pathology, pathophysiology, diagnostic testing, newborn screening and therapies. *International Society for Developmental Neuroscience*. 2020 Feb;80(1), 52-72. doi: 10.1002/jdn.10003.
- [13] Ensembl genome browser 109.301 Moved Permanently [online]. 2023. <https://www.ensembl.org/index.html>
- [14] National Library of Medicine. ABCD1. *National Center for Biotechnology Information; Gene database* [online]. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ABCD1>
- [15] RATTAY, T.W., RAUTENBERG, M., SÖHN, A.S. *et al.* Defining diagnostic cutoffs in neurological patients for serum very long chain fatty acids (VLCFA) in genetically confirmed X-Adrenoleukodystrophy. *Scientific Reports* **10**, 15093 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71248-8>
- [16] GUJRAL J., SETHURAM S. An update on the diagnosis and treatment of adrenoleukodystrophy. *Current opinion in endocrinology, diabetes and obesity*. 2023 Feb 1;30(1), 44-51. doi: 10.1097/MED.0000000000000782.
- [17] EICHLER FS., REN JQ., COSSOY M., RIETSCH AM., NAGPAL S., MOSER AB., FROSCH MP., RANSOHOFF RM. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Annals of Neurology*. 2008 Jun;63(6), 729-42. doi: 10.1002/ana.21391. PMID: 18571777.
- [18] Morita M., Imanaka T. Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2012, **2012**(9), 1387-1396. doi:10.1016/j.bbadis.2012.02.009
- [19] VARHAUG KN., TORKILDSEN Ø., MYHR KM., VEDELER CA. Neurofilament Light Chain as a Biomarker in Multiple Sclerosis. *Frontiers of Neurology*. 2019 Apr 5;10, 338. doi: 10.3389/fneur.2019.00338.
- [20] MATSUKAWA T., ASHEUER M., TAKAHASHI Y., GOTO J., SUZUKI Y., SHIMOZAWA N., TAKANO H., ONODERA O., NISHIZAWA M., AUBOURG P., TSUJI S. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*. 2011 Feb;12(1), 41-50. doi: 10.1007/s10048-010-0253-6.

- [21] BARENDSEN RW., DIJKSTRA IME., VISSER WF., ALDERS M., BLIEK J., BOELEN A., BOUVA MJ., VAN DER CRABBEN SN., ELSINGHORST E., VAN GORP AGM., HEIJBOER AC., JANSEN M., JASPERS YRJ., VAN LENTHE H., METGOD I., MOOIJ CF., VAN DER SLUIJS EHC., VAN TROTSENBURG ASP., VERSCHOOF-PUITE RK., VAZ FM., WATERHAM HR., WIJBURG FA., ENGELEN M., DEKKERS E., KEMP S. Adrenoleukodystrophy Newborn Screening in the Netherlands (SCAN Study): The X-Factor. *Frontiers of Cell and Developmental Biology*. 2020 Jun 17;8, 499. doi: 10.3389/fcell.2020.00499.
- [22] SCHACKMANN MJ., OFMAN R., DIJKSTRA IM., WANDERS RJ., KEMP S. Enzymatic characterization of ELOVL1, a key enzyme in very long-chain fatty acid synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015 Feb;1851(2), 231-7. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.12.005.
- [23] ENCARNACIÓN A., SUSANNE S., HERRERA E. Evaluation of two methods for plasma fatty acid analysis by GC. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2011, **2011**(113), 711-716. doi: 10.1002/ejlt.201000476
- [24] T JULOSKI J., POPOVIC T., MARTACIC JD., V CUK V., S MILIC PEROVIC M., S STANKOVIC M., M TRBOVICH A., LUKA SR. Fatty acid in colorectal cancer in adult and aged patients of both sexes. *Journal of B.U.ON:official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2021 Sep-Oct;26(5), 1898-1907.
- [25] ARIPOVSKY AV., KOLESNIK PO., KULAGINA TP., TITOV VN. Preparation of samples for gas-chromatographic determination of fatty acids: direct transesterification of lipids of dry biological sample is preferred in comparison with the methods employing preliminary lipid extraction. *Klinicheskaia laboratornaia diagnostika*. 2018;63(3), 141-147. Russian. doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147.
- [26] LÖFGREN L., FORSBERG GB., STÅHLMAN M. The BUME method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Scientific Reports*. 2016 Jun 10;6, 27688. doi: 10.1038/srep27688.
- [27] ZHANG M., YU Q., GUO J., WU B., KONG X. Review of Thin-Layer Chromatography Tandem with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Analytes in Mixture Samples. *Biosensors* (Basel). 2022 Oct 28;12(11), 937. doi: 10.3390/bios12110937.
- [28] SANTIAGO M., STROBEL S. Thin layer chromatography. *Methods in enzymology*. 2013;533, 303-324. doi: 10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6.

- [29] RICHTR V., KRAITR M. TENKOVSTVÁ CHROMATOGRRAFIE VE VÝUCE CHEMIE. In: *CHEMIE XX* [online]. Plzeň: Katedra chemie Západočeské univerzity v Plzni, 2004. https://old.fpe.zcu.cz/export/sites/fpe/kch/dokumenty/Priloha_III.pdf
- [30] MOTYKA K., HLAVÁČ J. *Stručný přehled separačních metod*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [31] BERNARD-SAVARY P., POOLE CF. Instrument platforms for thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015 Nov 20;1421, 184-202. doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.002.
- [32] Donau Lab Prague. Tenkovstvá chromatografie (TLC/HPTLC) *Donau Lab Prague* [online]. Praha. https://www.donaulab.cz/produkty/chromatograficke/tenkovstva-chromatografie?gclid=CjwKCAiAkrWdBhBkEiwAZ9cdcIuge6yRP5XUAJEA2RXzG6T0OC HsiEU6AMjkrGgod-Rwuzv2tQzwZRoCgCUQAvD_BwE
- [33] OSTERMANN AI., MÜLLER M., WILLENBERG I., SCHEBB NH. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography – a comparison of different derivatization and extraction procedures. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2014 Dec;91(6), 235-41. doi: 10.1016/j.plefa.2014.10.002.
- [34] ICHIHARA K., FUKUBAYASHI Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of lipid research*. 2010 Mar;51(3), 635-40. doi: 10.1194/jlr.D001065.
- [35] HPST NAVARA V. Teorie, praxe a údržba: GC – Plynová chromatografie – základy a principy. *LabRulez GCMS* [online]. 2020. <https://gcms.cz/article/854>
- [36] POLÍVKOVÁ J. ELDIAG s.r.o. Seznámení s plynovou chromatografií. *ELDIAG s.r.o. – akreditovaná zkušební laboratoř č. 1226* [online]. 2023. Praha: ELDIAG. <https://www.eldiag.cz/seznameni-s-plynovou-chromatografi/>
- [37] ČESLOVÁ L. Plynová chromatografie. Pardubice, 2021. *Výuková prezentace*. Univerzita Pardubice.
- [38] LACINA P. *Využití plynové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách* [online]. Brno, 2009. <https://core.ac.uk/download/pdf/30295642.pdf>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.

- [39] *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha: VŠCHT, 2018. https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-4%20GC-2-KOLONY-SF_JP2018.pdf
- [40] KISELEVA O., KURBATOV I., ILGISONIS E., POVERENNAYA E. Defining Blood Plasma and Serum Metabolome by GC-MS. *Metabolites*. 2021 Dec 24;12(1), 15. doi: 10.3390/metabo12010015.
- [41] NOVÁK F., BOROVSÁ J., VECKA M., et al. Změny ve složení mastných kyselin v lipidech plazmy a erytrocytů u kriticky nemocných v průběhu sepse. *Časopis lékařů českých* [online]. 2010, **2010**(7), 324-331.
- [42] RIOUX V., PÉDRONO F., LEGRAND P. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011 Jan;1811(1):1-8. doi: 10.1016/j.bbalip.2010.09.005.
- [43] ZAZULA R., PRŮCHA M., PEHAL F., DRYAHINA K., MORAVEC M., MÜLLER M., NEJTEK T. Kinetics of Myristic Acid Following Accidentally Induced Septic Response. *Prague medical report*. 2019;120(2-3), 103-106. doi: 10.14712/23362936.2019.15.
- [44] ZAZULA R., MORAVEC M., PEHAL F., NEJTEK T., PROTUŠ M., MÜLLER M. Myristic Acid Serum Levels and Their Significance for Diagnosis of Systemic Inflammatory Response, Sepsis, and Bacteraemia. *Journal of personalized medicine*. 2021 Apr 16;11(4), 306. doi: 10.3390/jpm11040306.
- [45] WANG S., WU D., LAMON-FAVA S., MATTHAN N.R, HONDA KL., LICHTENSTEIN AH. In vitro fatty acid enrichment of macrophages alters inflammatory response and net cholesterol accumulation. *The British journal of nutrition*. 2009 Aug;102(4), 497-501. doi: 10.1017/S0007114509231758..
- [46] TSOUKALAS D., FRAGOULAKIS V., SARANDI E., DOCEA AO., PAPAKONSTANINOU E., TSILIMIDOS G., ANAMATEROU C., FRAGKIADAKI P., ASCHNER M., TSATSAKIS A., DRAKOULIS N., CALINA D. Targeted Metabolomic Analysis of Serum Fatty Acids for the Prediction of Autoimmune Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2019 Nov 1;6, 120. doi: 10.3389/fmolb.2019.00120.

- [47] TO NB., TRUONG VN., EDIRIWEERA MK., CHO SK. Effects of Combined Pentadecanoic Acid and Tamoxifen Treatment on Tamoxifen Resistance in MCF-7/SC Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*. 2022 Sep 26;23(19), 11340. doi: 10.3390/ijms231911340.
- [48] JENKINS B., WEST JA., KOULMAN A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic Acid (c15:0) and heptadecanoic Acid (c17:0) in health and disease. *Molecules*. 2015 Jan 30;20(2), 2425-44. doi: 10.3390/molecules20022425.
- [49] IMAMURA F, FRETTS A, MARKLUND M, ARDISSON KORAT AV, YANG WS, LANKINEN M, QURESHI W, HELMER C, CHEN TA, WONG K, BASSETT JK, MURPHY R, TINTLE N, YU CI, BROUWER IA, CHIEN KL, FRAZIER-WOOD AC, DEL GOBBO LC, DJOUSSÉ L, GELEIJNSE JM, GILES GG, DE GOEDE J, GUDNASON V, HARRIS WS et. all. Fatty Acids and Outcomes Research Consortium (FORCE). Fatty acid biomarkers of dairy fat consumption and incidence of type 2 diabetes: A pooled analysis of prospective cohort studies. *PLoS medicine*. 2018 Oct 10;15(10), e1002670. doi: 10.1371/journal.pmed.1002670.
- [50] YOO W., GJUKA D., STEVENSON HL., SONG X., SHEN H., YOO SY., WANG J., FALLON M., IOANNOU GN., HARRISON SA., BERETTA L. Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLoS One*. 2017 Dec 15;12(12), e0189965. doi: 10.1371/journal.pone.0189965.
- [51] To NB, NGUYEN YT, MOON JY, EDIRIWEERA MK, CHO SK. Pentadecanoic Acid, an Odd-Chain Fatty Acid, Suppresses the Stemness of MCF-7/SC Human Breast Cancer Stem-Like Cells through JAK2/STAT3 Signaling. *Nutrients*. 2020 Jun 3;12(6), 1663. doi: 10.3390/nu12061663.
- [52] BERMÚDEZ MA., PEREIRA L., FRAILE C., VALERIO L., BALBOA MA., BALSINDE J. Roles of Palmitoleic Acid and Its Positional Isomers, Hypogeic and Sapienic Acids, in Inflammation, Metabolic Diseases and Cancer. *Cells*. 2022 Jul 8;11(14), 2146. doi: 10.3390/cells11142146.
- [53] PARK HG., KOTHAPALLI KSD., PARK WJ., DEALLIE C., LIU L., LIANG A., LAWRENCE P., BRENNAN JT. Palmitic acid (16:0) competes with omega-6 linoleic and omega-3 α -linolenic acids for FADS2 mediated Δ 6-desaturation. *Biochimica et biophysica acta*. 2016 Feb;1861(2), 91-97. doi: 10.1016/j.bbali.2015.11.007.

- [54] FISCHER CL., DAWSON DV., BLANCHETTE DR., DRAKE DR., WERTZ PW., BROGDEN KA. Protein Analysis of Sapientic Acid-Treated *Porphyromonas gingivalis* Suggests Differential Regulation of Multiple Metabolic Pathways. *Journal of bacteriology*. 2015 Oct 19;198(1), 157-67. doi: 10.1128/JB.00665-15.
- [55] SANSONE A., TOLIKA E., LOUKA M., SUNDA V., DEPLANO S., MELCHIORRE M., ANAGNOSTOPOULOS D., CHATGILIALOGLU C., FORMISANO C., DI MICCO R., FARAONE MENNELLA MR., FERRERI C. Hexadecenoic Fatty Acid Isomers in Human Blood Lipids and Their Relevance for the Interpretation of Lipidomic Profiles. *PLoS One*. 2016 Apr 5;11(4), e0152378. doi: 10.1371/journal.pone.0152378.
- [56] KÜÇÜKSAYAN E., SANSONE A., CHATGILIALOGLU C., OZBEN T., TEKELI D., TALIBOVA G., FERRERI C. Sapientic Acid Metabolism Influences Membrane Plasticity and Protein Signaling in Breast Cancer Cell Lines. *Cells*. 2022 Jan 11;11(2), 225. doi: 10.3390/cells11020225.
- [57] VRIENS K., CHRISTEN S., PARIK S., BROEKAERT D., YOSHINAGA K., TALEBI A., DEHAIRS J., ESCALONA-NOGUERO C., SCHMIEDER R., CORNFIELD T., CHARLTON C., ROMERO-PÉREZ L., ROSSI M., RINALDI G., ORTH MF., BOON R., KERSTENS A., KWAN SY., FAUBERT B., MÉNDEZ-LUCAS A., KOPITZ CC., CHEN T. et al. Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature*. 2019 Feb;566(7744), 403-406. doi: 10.1038/s41586-019-0904-1
- [58] BUENO-HERNÁNDEZ N., SIXTOS-ALONSO MS., MILKE GARCÍA MDP., YAMAMOTO-FURUSHO JK. Effect of Cis-palmitoleic acid supplementation on inflammation and expression of HNF4 γ , HNF4 α and IL6 in patients with ulcerative colitis. *Minerva gastroenterologica e dietologica*. 2017 Sep;63(3), 257-263. doi: 10.23736/S1121-421X.17.02367-4.
- [59] DJOUSSÉ L., WEIR NL., HANSON NQ., TSAI MY., GAZIANO JM. Plasma phospholipid concentration of cis-palmitoleic acid and risk of heart failure. *Circulation. Heart failure*. 2012 Nov;5(6), 703-9. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.967802.
- [60] HUANG WW., HONG BH., BAI KK., TAN R., YANG T., SUN JP., YI RZ., WU H. Cis- and Trans-Palmitoleic Acid Isomers Regulate Cholesterol Metabolism in Different Ways. *Frontiers in pharmacology*. 2020 Dec 8;11, 602115. doi: 10.3389/fphar.2020.602115.

- [61] BLOCK R., KAKINAMI L., LIEBMAN S., SHEARER GC., KRAMER H., TSAI M. Cis-vaccenic acid and the Framingham risk score predict chronic kidney disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2012 Apr;86(4-5), 175-82. doi: 10.1016/j.plefa.2012.02.009.
- [62] DJOUSSÉ L., MATSUMOTO C., HANSON NQ., WEIR NL., TSAI MY., GAZIANO JM. Plasma cis-vaccenic acid and risk of heart failure with antecedent coronary heart disease in male physicians. *Clinical nutrition: official journal of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2014 Jun;33(3), 478-82. doi: 10.1016/j.clnu.2013.07.001.
- [63] LI L., ZHU Y., WU J., HINKLE SN., TOBIAS DK., MA RCW., WEIR NL., TSAI MY., ZHANG C. Changes of Plasma Phospholipid Fatty Acids Profiles in Pregnancy in Relation to the Diagnosis and Treatment of Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical chemistry*. 2021 Nov 26;67(12), 1660-1675. doi: 10.1093/clinchem/hvab169.
- [64] ZLATANOS SN., LASKARIDIS K., SAGREDOS A. Conjugated linoleic acid content of human plasma. *Lipids in health and disease*. 2008 Sep 30;7, 34. doi: 10.1186/1476-511X-7-34.
- [65] LOCK AL., CORL BA., BARBANO DM., BAUMAN DE., IP C. The anticarcinogenic effect of trans-11 18:1 is dependent on its conversion to cis-9, trans-11 CLA by delta9-desaturase in rats. *The Journal of Nutrition*. 2004 Oct;134(10), 2698-704. doi: 10.1093/jn/134.10.2698.
- [66] CHEN BQ., YANG YM., GAO YH., LIU JR., XUE YB., WANG XL., ZHENG YM., ZHANG JS., LIU RH. Inhibitory effects of c9, t11-conjugated linoleic acid on invasion of human gastric carcinoma cell line SGC-7901. *World journal of gastroenterology*. 2003 Sep;9(9), 1909-14. doi: 10.3748/wjg.v9.i9.1909.
- [67] BERGAMO P., COCCA E., MONACO A., COZZOLINO V., BOSCAINO F., FERRANDINO I., MAURANO F., ROSSI M. Protective effect of Rumenic acid rich cow's milk against colitis is associated with the activation of Nrf2 pathway in a murine model. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2017 Oct;125, 14-23. doi: 10.1016/j.plefa.2017.08.006.
- [68] SEQUEIRA V. When fat meets the engine: implications of dietary rumenic acid on myosin-targeting therapies in heart failure. *The Journal of physiology*. 2021 Aug;599(15), 3635-3636. doi: 10.1113/JP281846.

- [69] PERTICI I., TAFT MH., GREVE JN., FEDOROV R., CAREMANI M., MANSTEIN DJ. Allosteric modulation of cardiac myosin mechanics and kinetics by the conjugated omega-7,9 trans-fat rumenic acid. *The Journal of physiology*. 2021 Aug;599(15), 3639-3661. doi: 10.1113/JP281563.
- [70] RASTGOO S., SHIMI G., SHIRASEB F., KARBASI A., ASHTARY-LARKY D., YOUSEFI M., GOLALIPOUR E., ASBAGHI O., ZAMANI M. The effects of conjugated linoleic acid supplementation on inflammatory cytokines and adipokines in adults: A GRADE-assessed systematic review and dose-response meta-analysis. *Frontiers in Immunology*. 2023 Feb 22;14, 1092077. doi: 10.3389/fimmu.2023.1092077.
- [71] SAITO Y., NAKAMURA K., ITO H. Effects of Eicosapentaenoic Acid on Arterial Calcification. *International journal of molecular sciences*. 2020 Jul 30;21(15), 5455. doi: 10.3390/ijms21155455.
- [72] MYHRE PL., KALSTAD AA., TVEIT SH., LAAKE K., SCHMIDT EB., SMITH P., NILSEN DWT., TVEIT A., SOLHEIM S., ARNESEN H., SELJEFLOT I. Changes in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and risk of cardiovascular events and atrial fibrillation: A secondary analysis of the OMEMI trial. *Journal of internal medicine*. 2022 May;291(5), 637-647. doi: 10.1111/joim.13442.
- [73] CHAPMAN MJ., ZAMORANO JL., PARHOFER KG. Reducing residual cardiovascular risk in Europe: Therapeutic implications of European medicines agency approval of icosapent ethyl/eicosapentaenoic acid. *Pharmacology & therapeutics*. 2022 Sep;237, 108172. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108172.
- [74] VANDERSLUIS L., MAZURAK VC., DAMARAJU S., FIELD CJ. Determination of the Relative Efficacy of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid for Anti-Cancer Effects in Human Breast Cancer Models. *International journal of molecular sciences*. 2017 Dec 4;18(12), 2607. doi: 10.3390/ijms18122607.
- [75] SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ P., RODRÍGUEZ MC., SÁNCHEZ-YAGÜE J. Identification of potential erythrocyte phospholipid fatty acid biomarkers of advanced lung adenocarcinoma, squamous cell lung carcinoma, and small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015 Jul;36(7), 5687-98. doi: 10.1007/s13277-015-3243-3.

[76] MORTEN G., CHRISTESTENSEN E., TOR-ARNE H., CHRISTOPHERSEN BJØRN O. The zellweger syndrome: Deficient conversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) and normal Δ^4 -desaturase activity in cultured skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* [online]. 1990, **1990**(2), 249-254 [cit. 2023-04-14]. doi:org/10.1016/0005-2760(90)90310-T