

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní program: kombinovaný
Studijní obor: biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Mgr. Barbora Staňková

Pokročilá lipidomika u vybraných klinických stavů

Advanced lipidomics in selected clinical conditions

Disertační práce

Školitel: RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 23. 7. 2019

Barbora Staňková

Proclamation:

I hereby state that I have prepared my thesis independently and that I have cited all the used references and other sources. I also state, that this work was not used to obtain any other academic degree.

I agree with archiving of my thesis in electronic form in the archive of the system Theses.cz, because of the possibility to search for instances of plagiarism.

Prague, the 23rd July 2019

Barbora Staňková

Identifikační záznam/Identification:

STAŇKOVÁ, Barbora: *Pokročilá lipidomika u vybraných klinických stavů. [Advanced lipidomics in selected clinical conditions]*. Praha, 2019. 102stran, 10 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika. Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Poděkování:

Děkuji své školitelce RNDr. Evě Tvrzické, CSc. za odborné vedení disertační práce a prof. MUDr. Aleši Žákovi, DrSc. za účinnou pomoc, cenné rady a připomínky, trpělivost a velkou podporu.

Dále chci poděkovat všem spoluautorům přikládaných publikací, především MUDr. Magdaléně Dušejovské, Ph.D., MUDr. Jaroslavu Macáškoví, Ph.D., RNDr. Janě Rychlíkové, Ph.D., RNDr. Lucii Vávrové, Ph.D., RNDr. Markovi Veckovi, Ph.D. a doc. MUDr. Miroslavu Zemanovi, CSc.

Za pomoc při zpracování biologického materiálu děkuji pracovníkům Laboratoře pro výzkum aterosklerózy Ivaně Smítalové a Jiřině Trávníčkové, za pomoc při shánění odborné literatury pak Stanislavě Eichlerové.

Studie, které jsou součástí této disertační práce, byly podpořeny výzkumnými projekty:

IGA NT/13199 Ministerstva zdravotnictví České republiky

IGA NS/9769-4 Ministerstva zdravotnictví České republiky

IGA NR/8806-3 Ministerstva zdravotnictví České republiky

PRVOUK-P25/LF1/2 Univerzita Karlova

PROGRES Q25/LF1 Univerzita Karlova

RVO-VFN 641265/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky

Seznam zkratk

AA	kyselina arachidonová
ABCA 1	ATP-dependentní kazetový transportér A1 (ATP-binding cassette transporter A-1)
ALA	kyselina α -linolenová
AMK	aminokyselina
AMP	adenosinmonofosfát
ANOVA	analysis of variance
Apo	apolipoprotein
ATP	adenosintrifosfát
CE	esterifikovaný cholesterol (cholesterol esters)
CETP	transferový protein esterů cholesterolu
CKD	chronické onemocnění ledvin
CM	chylomikra
CMr	remnantní chylomikra
CMP	cévní mozková příhoda
CoA	koenzym A
CRP	C-reaktivní protein
ChP	chronická pankreatitida
DHA	dokosahexaenová kyselina
DHGLA	kyselina dihomo- γ -linolenová
DM	diabetes mellitus
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EFA	esenciální mastné kyseliny (essential fatty acids)
ELISA	heterogenní enzymová imunoanalýza (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay)
EPA	kyselina eikosapentaenová
ESRD	konečné stádium onemocnění ledvin (end-stage renal disease)
FA	mastné kyseliny (fatty acids)
FADS	desaturasa mastných kyselin (fatty acid desaturase)
FAEE	etyl estery mastných kyselin (fatty acid ethyl esters)
FC	volný cholesterol (free cholesterol)
GC	plynová chromatografie (gass chromatography)

GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaný glutathion
HD	hemodialýza
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HDL-C	cholesterol v HDL (high density lipoprotein-cholesterol)
HETE	kyselina hydroxyeikosatetraenová
HL	jaterní lipasa
HLP	hyperlipoproteinémie
HNF	jaterní nukleární faktor
HTG	hypertriacylglycerolemie
IDL	lipoprotein o střední hustotě (intermediate density lipoprotein)
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
IM	infarkt myokardu
IR	inzulínová rezistence
KAT	katalasa
KD	konjugované dieny (conjugated dienes)
KON	kontrolní skupina
KP	karcinom pankreatu
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LA	kyselina linolová (linoleic acid)
LTB ₄	leukotrien B ₄
LCAT	lecitin: cholesterolacyltransferasa
LCFA	masné kyseliny s dlouhým řetězcem (long chain FA)
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LDL-R	LDL receptor
LP	lipoprotein/y
Lp(a)	lipoprotein (a)
LPL	lipoproteinová lipasa
LRP	protein příbuzný LDL-receptoru (CM receptor), (LDL receptor related protein)

LTB4	leukotrien B4
LXR	játerní receptor X
MAP	mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinases)
MCFA	mastné kyseliny se středním řetězcem (medium chain FA)
MCP-1	monocytární chemoatraktantní protein 1 (monocyte chemoattractant protein-1)
MetS	metabolický syndrom
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated FA)
NAD	nikotin amid adenin dinukleotid
NADP	nikotine amid adenine dinukleotid fosfát
NEFA	neesterifikované (volné) mastné kyseliny (non-esterified fatty acids)
NOS	syntasa oxidu dusnatého
OA	kyselina olejová
ox-LDL	oxidačně modifikované LDL
OS	oxidační stres
PA	kyselina palmitová
PCT	prokalcitonin
PGJ ₂	prostaglandin J ₂
PL	fosfolipidy (phospholipids)
POA	kyselina palmitolejová
PON	paraoxonasa
PON-A	arylesterasová aktivita PON 1
PON-L	laktonasová aktivita PON1
PON1-P	paraoxonasová aktivita PON1 (paraoxonase activity of PON1)
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomálními proliferátory (peroxisomal proliferator activated receptor)
PUFA	vícenenasyčené mastné kyseliny (polyunsaturated FA)
RCT	reverzní transport cholesterolu
RF	rizikový faktor
RONS	reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species/nebo substances)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species/nebo substances)

SA	kyselina stearová
SAA	sérový amyloid A
SCD	stearoyl-CoA desaturasa
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids)
S.D.	směrodatná odchylka (standard deviation)
sd-LDL	malé denzní LDL (small dense LDL)
SOD	superoxiddismutasa
SREBP	bílkovina vázající se na sekvence regulující steroly (sterol regulatory element binding protein)
TAG	triacylglyceroly (triglycerides)
TC	celkový cholesterol (total cholesterol)
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1, 3-diol
TRL	lipoproteiny bohaté TAG (triglyceride rich lipoproteins)
SFA	nasyčené mastné kyseliny (saturated FA)
SR-B1	scavengerový receptor typu B1 (scavenger receptor class B type 1)
VA	kyselina vakcenová
VLCFA	mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (very long chain FA)
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins)

OBSAH

1.	Úvod.....	12
2.	Klinicky významné lipidní látky.....	14
2.1.	Mastné kyseliny	14
2.2.	Desaturasy mastných kyselin.....	17
2.3.	Triacylglyceroly.....	18
2.4.	Neesterifikované mastné kyseliny	18
2.5.	Fosfolipidy	19
2.6.	Cholesterol.....	19
2.7.	Lipoproteiny.....	19
3.	Apolipoproteiny	24
3.1.	Apolipoprotein B-48	24
4.	Metabolismus lipoproteinů	26
5.	Význam lipidů v patogenezi vybraných onemocnění.....	29
5.1.	Ateroskleróza a kardiovaskulární onemocnění.....	29
5.2.	Metabolický syndrom	30
5.3.	Konečné stádium onemocnění ledvin	30
5.4.	Chronická pankreatitida a karcinom pankreatu	32
6.	Oxidační stres a chronický zánět	33
6.1.	Oxidačně modifikované lipidy.....	33
6.1.1.	Dysfunkční HDL	34
6.1.2.	Oxidačně modifikované LDL.....	34
6.1.3.	Konjugované dieny.....	35
6.2.	Antioxidační enzymy	36
6.2.1.	Paraoxonasa 1	36
7.	Význam stanovení konvenčních lipidových parametrů.....	37

8.	Význam pokročilé lipidomiky	38
8.1.	Cílená analýza lipidových parametrů	38
8.2.	Uplatnění pokročilých metod statistické analýzy	38
9.	Hypotézy a cíle práce.....	40
10.	Materiál a metody	41
10.1.	Studované patologické stavy.....	41
10.2.	Preanalytická fáze	43
10.3.	Stanovení profilu mastných kyselin	43
10.3.1.	Extrakce celkového lipidu	44
10.3.2.	Separace jednotlivých lipidových tříd	44
10.3.3.	Analýza profilu mastných kyselin	44
10.4.	Stanovení neesterifikovaných mastných kyselin	45
10.5.	Stanovení ApoB-48.....	46
10.6.	Separace lipoproteinů a analýza lipoproteinových subfrakcí.....	46
10.7.	Stanovení lipidových markerů oxidačního stresu	47
10.7.1.	Konjugované dieny	48
10.7.2.	Oxidačně modifikované LDL	48
10.8.	Stanovení aktivity paraoxonasy 1	49
10.8.1.	Arylesterasová aktivita PON	49
10.8.2.	Laktonasová aktivita PON	49
10.9.	Stanovení sérového amyloidu A	50
10.10.	Statistická analýza	50
11.	Výsledky	52
11.1.	Metabolický syndrom.....	52
11.2.	Karcinom pankreatu	58
11.3.	Chronická pankreatitida	59
11.4.	Konečné stádium onemocnění ledvin	61

11.5.	Pacienti s rozdílnými hladinami ApoB-48	64
12.	Diskuse.....	67
12.1.	Mastné kyseliny	67
12.1.1.	Metabolický syndrom	67
12.1.2.	Pacienti se zvýšenou hladinou apoB-48	68
12.1.3.	Karcinom pankreatu.....	69
12.1.4.	Chronická pankreatitida	70
12.2.	Profil lipoproteinových částic	72
12.2.1.	Konečné stádium onemocnění ledvin	72
12.2.2.	Pacienti se zvýšenou hladinou apoB-48	73
12.3.	Lipidové parametry oxidační rovnováhy	73
12.3.1.	Metabolický syndrom	74
12.3.2.	Pacienti se zvýšenou hladinou apoB-48	75
12.3.3.	Karcinom pankreatu.....	76
12.3.4.	Chronická pankreatitida	76
13.	Závěr	78
14.	Souhrn.....	80
15.	Summary	81
16.	Literatura.....	82
17.	Publikační činnost.....	97
17.1.	Publikace se vztahem k disertaci.....	97
17.1.1.	Publikace s IF.....	97
17.1.2.	Publikace bez IF.....	98
17.2.	Publikace bez vztahu k disertaci	98
17.2.1.	Publikace s IF.....	98
18.	Seznam příloh	101

1. Úvod

Přestože v posledních desetiletích došlo v ekonomicky vyspělých zemích, včetně České republiky, k podstatnému poklesu mortality na kardiovaskulární onemocnění (KVO), onemocnění srdce a cév zůstávají nadále nejčastější příčinou smrti. Tyto příznivé změny byly asociovány s významným poklesem průměrné koncentrace cholesterolu v lipoproteinu o nízké hustotě (LDL, low density lipoprotein) i zvýšením počtu osob dosahujících jeho cílové hodnoty. Tento jev je důsledkem změny životního stylu (převážně dietních zvyklostí) a účinné statinové léčby. Nicméně nedaří se snižovat prevalenci kuřáctví, nadváhy i obezity, metabolického syndromu (MetS) a diabetu mellitu (DM) 2. typu.

V současné době se ateroskleróza považuje za lokální odpověď zánětlivého, resp. imunitního charakteru s rysy nadměrné proliferativní reakce intimy a medie tepen na podněty nejrůznější etiologie, mezi nimiž klíčovou roli mají oxidačně modifikované lipoproteiny, především LDL (ox-LDL).

V časném stádiu vývoje aterosklerotické léze mají prvořadý význam dva patofyziologické děje – zachycení a průnik leukocytů do cévní stěny a vstup lipoproteinů, především LDL, do cévní stěny a jejich mírná oxidační modifikace, za vzniku minimálně modifikovaných LDL (mm-LDL). Ta je signálem pro aktivaci endotelu a expresi a syntézu cytokinů MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) či interleukinu 8 (IL-8). Na aktivaci endotelových buněk se podílejí i další faktory jako jsou zvýšené koncentrace chylomiker (CM) či lipoproteinu o velmi nízké hustotě (VLDL) a jejich remnantních částic, turbulentní krevní proudění, působení reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a hyperglykémie. Po průniku cévní stěnou sekvstrují nativní LDL i mm-LDL v subendotelovém prostoru a jsou dále oxidačně modifikovány na ox-LDL, které mají odlišné biologické vlastnosti oproti nativním LDL. Na přeměně LDL a mm-LDL na ox-LDL se podílejí všechny komponenty cévní stěny - endotel, hladké svalové buňky, monocyty a makrofágy (Žák A., 2000).

Mechanismy vedoucí k rozvoji aterosklerózy jsou především oxidační stres (OS) a chronický zánět. Při oxidačním stresu dochází působením volných radikálů k peroxidaci jak lipoproteinových částic, tak i fosfolipidů a esterů cholesterolu v buněčné membráně.

Oxidované lipidy dále aktivně podporují zánětlivou odpověď interakcí s endotelovými a imunitními buňkami (makrofágy), (Štípek S. et al., 2000).

Nemoci oběhové soustavy se v roce 2017 na celkovém počtu úmrtí v České republice podílely ze 40 % u mužů a 48 % u žen (ÚZIS, 2018). Na kardiovaskulární komplikace tak zemřelo více než 49 tisíc osob. Podíl zemřelých na nemoci oběhové soustavy setrvala roste u obou pohlaví s věkem a od věku 55 let již úmrtí v důsledku onemocnění oběhové soustavy zcela převažují. Zvyšování počtu úmrtí na KVO je celosvětově způsobeno růstem populace a prodlouženou délkou života. Prevence a léčba KVO je proto globální výzvou v oblasti veřejného zdraví. Úspěšná léčba dyslipidémie statiny změnila pohled na rizikové faktory KVO. Kromě studia kardiometabolických onemocnění (jako jsou choroby srdce a cév, obezita, metabolický syndrom a DM 2. typu) je v popředí zájmu také studium zhoubných nádorů.

Jedním z nejdůležitějších aspektů lipidomiky při výzkumné činnosti v oblasti civilizačních nemocí (především srdečně-cévních chorob a zhoubných nádorů) je snaha o identifikaci nových sloučenin, které by mohly být použity jako jejich klinické biomarkery. Identifikace rizikových profilů metabolomů má potenciál zlepšit stratifikaci rizika a včasný záchyt KVO. Lipidomika patří k nejnovějším přístupům při hledání nových prediktivních biomarkerů jak z hlediska predikce rizika srdečně cévních onemocnění, jejich diagnostiky, prognózy i monitorování účinnosti léčby či pro lepší pochopení jejich patogeneze. Izolované hodnocení jednotlivých biomarkerů již k interpretaci nebo charakterizaci komplexních biologických jevů nestačí. Nové metabolomické přístupy kladou důraz na charakterizaci vzájemných vztahů mezi metabolity, studují tzv. metabolický „otisk“ onemocnění a jeho preklinických stavů.

Nové analytické metody poskytují často řadu paralelních dat, která obsahují velká množství informací, které lze vytěžit pouze novými interpretačními přístupy. Vícerozměrná analýza a její metody jsou naprosto nezbytné. Mezi metody vícerozměrné analýzy patří faktorová analýza, clusterová analýza, metoda hlavních komponent a kanonické korelace, které umožňují interpretovat matrice pozorovaných dat přijatelnými hypotézami. Clusterová analýza vnáší strukturu do „chaosu“ dat tím, že roztřídí nositele znaků do homogenních skupin. Seskupením metabolicky podobných jedinců lze dosáhnout cílené a efektivnější jak dietní, tak i lékové intervence u pacientů s metabolickým onemocněním (Riedl A. et al., 2017).

2. Klinicky významné lipidní látky

Mezi lipidní látky (lipidy a izoprenoidy) patří heterogenní skupina biomolekul, které jsou odlišné strukturálně, ale blízké svými fyzikálními vlastnostmi, jako například rozpustností v organických rozpouštědlech či hydrofobním charakterem. Klinicky významnými lipidními látkami jsou mastné kyseliny (FA, fatty acids), neesterifikované (volné) FA (NEFA, non-esterified fatty acids), triacylglyceroly (TAG) a fosfolipidy (PL, phospholipids), z izoprenoidů pak volný cholesterol (FC, free cholesterol) a esterifikovaný cholesterol (CE, cholesterol esters). Cholesterol, spolu s lipidy a FA v nich obsažených, plní řadu biologických funkcí.

2.1. Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou jednak základními strukturálními jednotkami jednoduchých i složených lipidů, jednak pohotovým a vydatným zdrojem energie. Z chemického hlediska to jsou monokarboxylové kyseliny s lineárním alifatickým řetězcem. V biologických systémech se většinou nacházejí nerozvětvené FA se sudým počtem uhlíkových atomů, který je dán způsobem biosyntézy FA z dvouuhlíkatých (acetylových) zbytků. Počet uhlíkových atomů se pohybuje od 2 do 36. U živočichů převažují FA s délkou uhlíkového řetězce C16-C18, kyseliny s kratším řetězcem než C14 nebo delším než C22 tvoří minoritní část.

Další charakteristikou FA je nasycený nebo nenasycený uhlíkový řetězec. Mastné kyseliny s nenasyceným uhlíkovým řetězcem se dělí na mononenasycené (MUFA, monounsaturated fatty acids) s přítomností jedné dvojně vazby a na vícenenasycené (PUFA, polyunsaturated fatty acids) s 2-6 dvojnými vazbami uspořádanými v *cis* nebo v *trans* konfiguraci. Přirozeně se vyskytující FA mají dvojně vazby uspořádané v *cis* konfiguraci. V lidském organismu bylo identifikováno přibližně 60 různých FA, nicméně pouze minoritní část zastává relevantní fyziologické funkce. Složení FA je charakteristické jak pro jednotlivé živočišné druhy, tak i pro jednotlivé tkáně (Tvrzická E. et al., 2011).

Základní fyzikálně-chemickou vlastností FA je bod tání. Jeho hodnota stoupá u nasycených FA s počtem atomů uhlíku alifatického řetězce. U nenasycených FA bod tání klesá s počtem dvojných vazeb. Tuto vlastnost vnášejí FA i do komplexních sloučenin, jejichž jsou významnou součástí (jako jsou např. PL a TAG) a výše organizovaných

struktur (buněčné membrány, plazmatické lipoproteiny). Dvojně vazby FA mají za fyziologických podmínek vždy konfiguraci *cis*, která způsobuje ohyb o 30 stupňů alifatického řetězce. Brání tak účinnému vyplnění prostoru, snižuje van der Waalsovy interakce a tím i bod tání. Stupeň desaturace (počet dvojných vazeb v *cis* konfiguraci) tak významně ovlivňuje mikroviskozitu buněčných membrán, jejich tloušťku a následně i funkci s nimi spojených bílkovin (enzymy, buněčné receptory, přenašeče a iontové kanály), (Žák A., 2013).

Mastné kyseliny mají v organismu celou řadu funkcí (tabulka 1), kdy jejich významné biochemické působení je předurčeno jejich fyzikálními a chemickými vlastnostmi. V TAG tukové tkáni FA slouží jako zdroj metabolické energie, mají rovněž mechanické a izolační vlastnosti. Mononenasyčené FA se účastní mnoha dějů včetně signální transdukce, buněčné diferenciaci (Bradley R. L. et al., 2008; Yonezawa T. et al., 2008), regulace apoptózy a procesu mutagenese v některých nádorech (Hardy S. et al., 2000). Kyselina palmitolejová produkovaná tukovou tkání hraje důležitou roli jako lipokin regulující celotělový lipidový metabolismus (Cao H. et al., 2008).

Vícenenasyčené FA odštěpené z PL jsou prekurzory fyziologicky i patofyziologicky důležitých molekul (např. eikosanoidů), podílejí se na buněčné signalizaci, modulují transkripci genů a jsou důležitými ligandy receptorů. V plazmatických lipoproteinech se uplatňuje jejich atero – či antiaterogenní působení, v biologických membránách jsou důležitým faktorem určujících jejich fluiditu a funkci s nimi asociovaných struktur (Žák A., 2013).

Tabulka 1: Funkce mastných kyselin

energetický zdroj	LCFA, VLCFA: 9,1 kcal/g MCFA: 7,0 kcal/g SCFA: energetický zdroj enterocytů a kolonocytů
strukturální součást buněčných membrán	tloušťka a fluidita buněčných membrán → funkce (počet a/nebo aktivita) s nimi asociovaných proteinů (enzymy, iontové kanály, receptory, transportéry)
substrát pro syntézu (a) AA, EPA, DHGLA (b) DHA	(a) eikosanoidů (prostaglandinů, leukotrienů, hydroxy-FA, izoprostanoidů, anandamidů) (b) dokosanoidů (resolviny, protektiny, maresiny)
acylace proteinů a ovlivnění jejich funkce	<ul style="list-style-type: none"> • ukotvení bílkovin acylací na buněčné membráně a změna její aktivity • acylace proteinu p21c-ras zvyšuje aktivitu MAP kinázy • acylace membrány kardiomyocytů hyperpolarizuje diastolický potenciál a tím zvyšuje elektrostabilitu a rezistenci na arytmogenní podněty
signální funkce	kyselina stearová stimuluje uvolňování inzulínu z β -buněk Langerhansových ostrůvků
ovlivnění funkce druhých posílů	diacylglycerol, inositoltrifosfát, laktosylceramid
modulátory genové transkripce 1. PPAR- α , - β/δ , - γ 1 a - γ 2; 2. LXR- α a β ; 3. HNF-4 α ; 4. SREBP-1 a -2; 5. ChREBP/MLX (EPA, DHA)	<ul style="list-style-type: none"> • regulace enzymů lipogeneze; • bio transformace PUFA-elongace, desaturace; • syntézy cholesterolu; • exprese glukózových transportérů, glukoneogeneze; • produkty LA a ALA-endogenní ligandy PPAR α, γ (PGJ₂, LTB₄, 8-S-HETE); • regulace zánětu; • biologie adipocytů

Zkratky: LCFA - mastné kyseliny s dlouhým řetězcem; VLCFA - mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem; MCFA - mastné kyseliny se středním řetězcem; SCFA - mastné kyseliny s krátkým řetězcem; AA-kyselina arachidonová; EPA - kyselina eikosapentaenová; DHGLA - kyselina dihomogamma-linolenová; LA- kyselina linolová; ALA- kyselina alfa-linolenová; MAP - mitogenem aktivované proteinkinázy; PPAR- receptor aktivovaný peroxisomálními proliferátory (peroxisomal proliferator activated receptor); PGJ₂ - prostaglandin J₂; LTB₄ -leukotrien B₄; HETE- kyselina hydroxyeikosatetraenová; HNF-jaterní nukleární faktor; LXR -jaterní receptor X; ChREBP/MLX - bílkovina vázající se na sekvence regulující glycidy/Max podobný faktor (carbohydrate response element binding protein/Max like factor X); SREBP- bílkovina vázající se na sekvence regulující steroly (sterol regulatory element binding protein),(Žák A., 2013).

2.2. Desaturasy mastných kyselin

Nenasycené FA vznikají inzercí dvojných vazeb do řetězce FA. Desaturace FA probíhá za účasti nehemových enzymů, tzv. desaturas. Existují dvě evolučně nepříbuzné skupiny desaturas: desaturasy vázané na buněčné membrány a desaturasy solubilní. Vesměs jde o metaloproteiny se dvěma atomy železa v aktivním místě, což vysvětluje velký rozsah jejich katalytických aktivit. Savčí desaturasy jsou mikrosomální enzymy schopné zavádět dvojnou vazbu v polohách C4, C5, C6 a C9 a jsou označovány $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ - a $\Delta 9$ -desaturasy (případně D4D, D5D, D6D, D9D), (Žák A. et al., 2016).

Aktivita savčích desaturas závisí na koordinaci vlastní desaturasy, cytochromu b5 a cytochrom-b5-reduktasy+NADPH+H⁺. Tento systém ovšem nedokáže vytvořit FA řady n-3 a n-6, proto jsou $\Delta 5$ desaturasa, resp. desaturasa mastných kyselin 1 (FADS, fatty acid desaturase) a $\Delta 6$ desaturasa, resp. FADS2 substrátově specifické pro esenciální mastné kyseliny (EFA), kyselinu linolovou (n-6) a α -linolenovou (n-3), (Žák A. et al., 2016).

Choroby asociované s inzulínovou rezistencí (IR) jako je nadváha/obezita, diabetes mellitus 2. typu, KVO a některé nádory jsou charakterizovány poklesem obsahu PUFA s dlouhým řetězcem a současně zvýšenou akumulací SFA i MUFA v tukové tkáni a dalších orgánech (játra, myokard, kosterní svalstvo a pankreas). Ze SFA se hromadí především kyseliny s C16 či C18, tzn. kyseliny palmitová (PA, 16:0) a stearová (SA, 18:0), z MUFA to jsou pak převážně kyseliny palmitolejová (POA, 16:1 n-7), vakcenová (VA, 18:1n-7) a olejová (OA, 18:1n-9). K akumulaci uvedených FA dochází v důsledku vysokého příjmu tuku potravou, nebo v důsledku stimulované lipogeneze *de novo* syntézou z netukových sloučenin, převážně sacharidů. Mezi enzymy lipogeneze *de novo* patří elongasa FA, která katalyzuje prodloužení PA na SA a POA na VA, a stearoyl-CoA desaturasa (SCD), která vnáší dvojnou vazbu do pozice $\Delta 9$ řetězce FA. Preferovanými substráty SCD, neboli $\Delta 9$ desaturasy, jsou palmitoyl- a stearoyl-CoA, jejichž přeměnou vznikají POA a OA (Žák A. et al., 2016). Aktivita SCD-1 je regulována geneticky, hormonálně i nutričně. Dále ji ovlivňuje řada faktorů zevního prostředí i chorobné stavy.

Experimentální studie s geneticky modifikovanými laboratorními zvířaty prokázaly, že ztráta aktivity SCD-1 je spojena se zlepšením metabolického profilu, zmírněním IR i odolností vůči rozvoji dietně indukované obezity (Žák A. et al., 2016). Z výše uvedených faktů vyplývá, že SCD, zvláště izoforma SCD-1, může být důležitým

terapeutickým cílem léčby metabolických chorob, DM, obezity ale i onkologických onemocnění.

2.3. Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou estery vyšších FA s trojsytným alkoholem – glycerolem. Podle počtu esterifikovaných hydroxylových skupin existují ještě mono – a diacylglyceroly. Klinicky nejvýznamnější jsou triacylglyceroly, které představují největší podíl lipidů v lidské potravě. U živočichů jsou TAG nejvýznamnější zásobní formou energie a jsou u nich také nejhojněji zastoupenou třídou lipidů, přestože nejsou složkou buněčných membrán.

2.4. Neesterifikované mastné kyseliny

Plazmatická koncentrace NEFA je za fyziologických podmínek velmi nízká a jejich složení je velmi podobné profilu FA v TAG (de Almeida I. T. et al., 2002). Volné FA jsou metabolicky velmi aktivní, mohou být oxidovány, reesterifikovány nebo elengovány či desaturovány. Většina NEFA je reesterifikována v játrech na TAG a PL, zvýšený přívod NEFA do jater tak zvyšuje hladinu substrátu pro tvorbu TAG, s následným zvýšením tvorby VLDL i LDL. Uvolnění NEFA z tukové tkáně je ovlivněno především aktivitou hormon-senzitivní lipasy.

Nedostatečná suprese lipolýzy spolu s IR má za následek zvýšenou koncentraci NEFA a jejich tok do jater a jiných orgánů. Inzulínová rezistence dále omezuje kapacitu tukové tkáně pro ukládání TAG a proto se již v časném stadiu IR (před manifestací abnormalit glukózové homeostázy) rozvíjí aterogenní dyslipidémie a dochází k ektopické akumulaci lipidů s projevy lipotoxicity.

Zvýšené plazmatické koncentrace NEFA v kombinaci s hyperglykemií urychlují tvorbu reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS, reactive oxygen and nitrogen species) i iniciaci a rozvoj endoteliální dysfunkce (Ghosh A. et al., 2017). Bylo prokázáno, že zvýšené koncentrace NEFA jsou jedním z významných faktorů ektopické akumulace tuků a lipotoxicity u obezity, DM 2. typu, MetS či nealkoholové steatózy jater (Lottenberg A. M. et al., 2012; Saponaro C. et al., 2015).

2.5. Fosfolipidy

Fosfolipidy, spolu se sfingomyelininy, cerebrosidy a gangliosidy, patří mezi složené lipidy a jsou hlavní lipidovou složkou biomembrán. Fosfolipidy jsou chemicky pestrá skupina biomolekul. Skládají se ze sn-glycerol-3-fosfátu, který je na sn-1 a sn-2 atomu uhlíku glycerolu esterifikován FA a na své fosforylové skupině má navázán vodík nebo jinou funkční skupinu.

2.6. Cholesterol

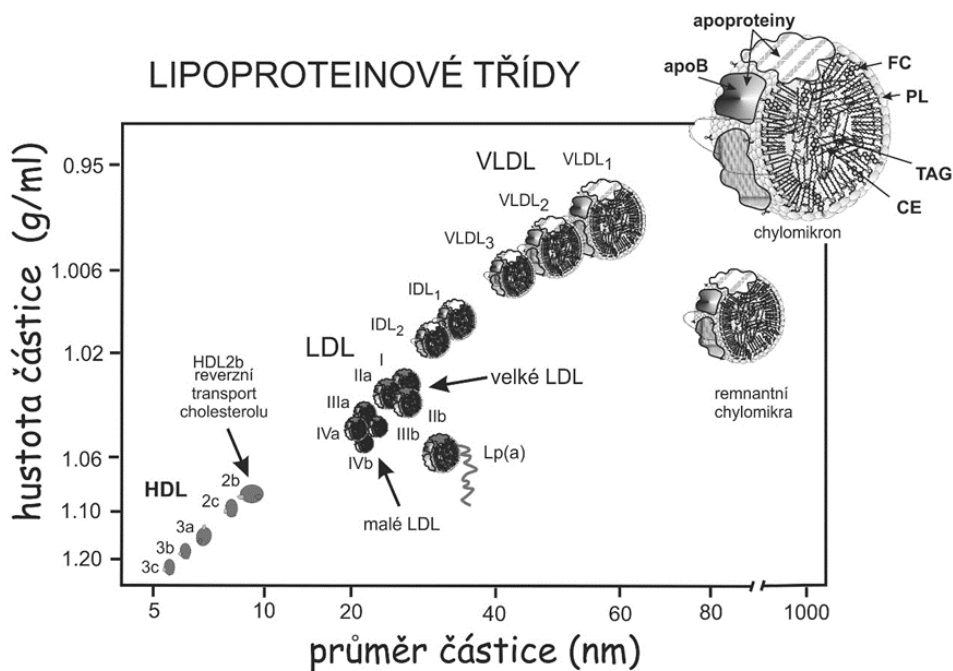
Cholesterol (cholest-5-en-3- β -ol) je derivát cyklopentanoperhydrofenantrenu. Je významnou součástí buněčných membrán a v menší míře je součástí také biomembrán nitrobuněčných organel. Hydroxylová (OH) skupina cholesterolu (lokalizovaná v β poloze na C3) má slabý amfipatický (polární) charakter a kondenzované cykly, které v porovnání s ostatními membránovými lipidy, cholesterolu zaručují vyšší stupeň stability. Se vzrůstajícím podílem cholesterolu v biomembránách se snižuje jejich viskozita.

Cholesterol je dále metabolickým prekurzorem steroidních hormonů a primárních žlučových kyselin (cholové a chenodesoxycholové), které vznikají v játrech jeho metabolickou transformací (Žák A., 2013).

2.7. Lipoproteiny

Lipoproteiny (LP) jsou částice, jejichž prostřednictvím jsou lipidy transportovány krví. Jedná se o makromolekulární komplexy složené podle typu částice z větší či menší části z PL, TAG, CE, FC a specifických bílkovin – apoproteinů (apolipoproteinů, apo). Podle hustoty, která je dána vzájemným poměrem lipidů a proteinů, je dělíme na CM, částice VLDL, částice o střední hustotě (IDL, intermediate density lipoprotein), částice LDL a částice o vysoké hustotě (HDL, high density lipoprotein). Rozdělení jednotlivých lipoproteinových tříd na základě hustoty a velikosti částic podává obrázek 1.

Lipoproteiny jsou tvořeny jádrem a obalem. Spojením apolipoproteinů se strukturálními (polárními, amfipatickými) lipidy, kterými jsou PL a FC, vzniká unilamelární membrána částice. Jádro LP se sestává z CE a TAG a v nich rozpuštěného menšího množství FC.



Obrázek 1: Lipoproteinové třídy

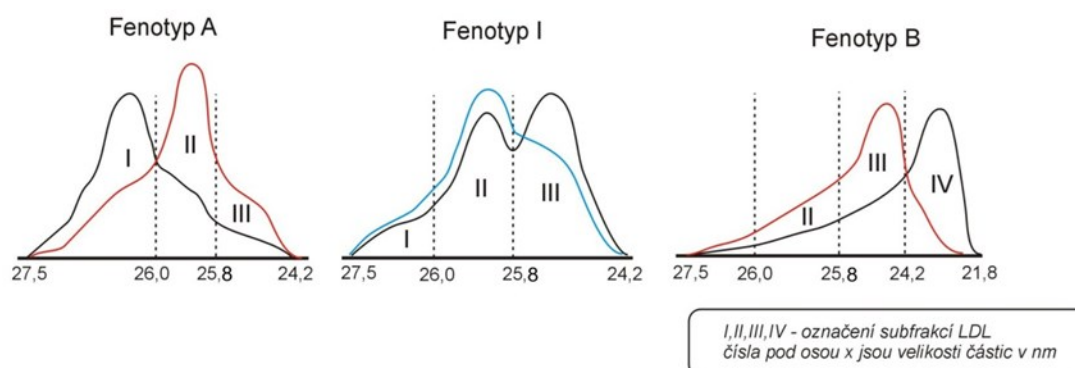
Zkratky: CE – cholesteryl estery, FC - volný cholesterol, PL - fosfolipidy, TAG - triacylglyceroly, apoB - apoprotein B, HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě, IDL – lipoproteiny o střední hustotě, LDL – lipoproteiny o nízké hustotě, VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě (Dušejovská M. et al., 2018).

Jednotlivé lipoproteiny je dále možné dělit podle velikosti a hustoty částic na příslušné subpopulace (subfrakce). Praktické využití má separace částic LDL, kdy podle zastoupení jednotlivých subfrakcí rozlišujeme lipoproteinový *fenotyp A*, *fenotyp B* a smíšený, neboli *intermediární (I) fenotyp* (obrázek 2). Gradientovou gelovou elektroforézou byl jako hranice odlišující malé částice od větších stanoven průměr částice 25,8 nm, gelovou elektroforézou v trubičkách pak i 26,8 nm (Berneis K. K. a Krauss R. M., 2002).

Z epidemiologických studií vyplynulo, že *fenotyp B* představuje samostatný rizikový faktor (RF) pro ischemickou chorobu srdeční (ICHS). Zčásti je nezávislý na plazmatických koncentracích TAG, HDL-C a apoB, avšak významně potencuje jejich účinky.

Malé denzní LDL (sd-LDL, subfrakce III a IV LDL) mají ve srovnání s LDL částicemi zdravých jedinců (subfrakce I a II), odlišné fyzikálně chemické i biologické vlastnosti (snadno podléhají oxidační modifikaci, snáze prostupují cévní stěnou, inhibicí syntasy NO a zvýšením exprese cytoadhezních molekul působí toxicky na endotel, v cévní stěně působí jako chemoatraktanty - atrahují monocyty a makrofágy a udržují tak subklinický zánět). Cirkulující částice sd-LDL mají nižší afinitu k LDL receptorům (apoB/E

receptory) v hepatocytech, což se projevuje jejich zpomaleným katabolismem, zejména v postprandiálním období.

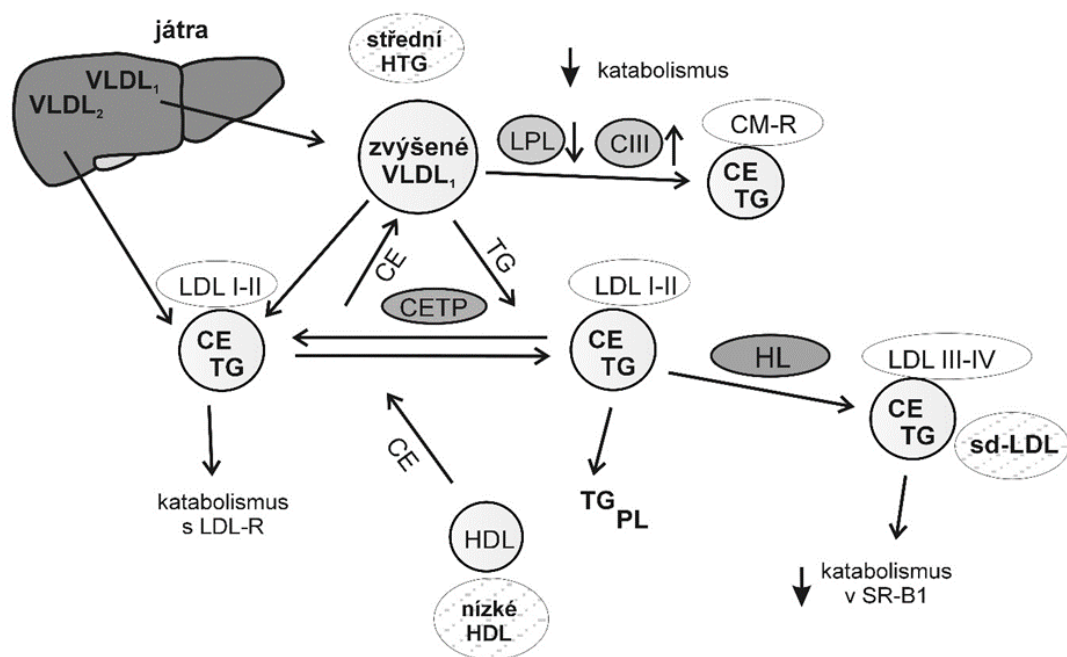


Obrázek 2: Fenotypy distribucí subpopulací částic LDL

(upraveno podle Rizzo M. a Berneis K., 2006)

Fenotyp A velikosti LDL je charakterizován převahou subfrakce LDL-I a LDL-II a je typický pro mladé premenopauzální ženy. *Intermediární (I) fenotyp* je charakterizován převahou subfrakce LDL-II a LDL-III a je typický pro zdravé muže. *Fenotyp B* je určen předominancí subfrakce LDL-III a LDL-IV a je typický pro aterogenní (resp. diabetickou) dyslipidémii u MetS (resp. DM 2. typu).

Převaha sd-LDL má přímou kauzální spojitost s hypertriacylglycerolémií (HTG) a přítomnost sd-LDL je asociována se zvýšeným rizikem KVO (Austin M.A. et al., 1988). K hlavním metabolickým prediktorům *fenotypu B* patří HTG, zvýšení aktivit jaterní lipasy (HL) a transferového proteinu esterů cholesterolu (CETP). Zvýšené zastoupení částic sd-LDL je jedním z rysů aterogenní dyslipidémie vznikající na podkladě IR. Mechanismus vzniku sd-LDL je schematicky znázorněn na obrázku 3, elektroforetický průkaz sd-LDL při analýze diskontinuální gelovou elektroforézou (Lipoprint LDL, Quantimetrix, USA) je ukázán na obrázku 4.

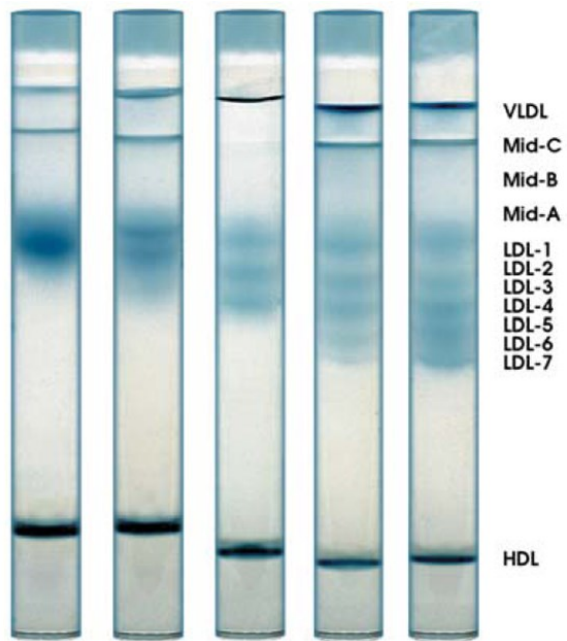


Obrázek 3: Mechanismus vzniku sd-LDL

Zkratky: CE – cholesteryl estery; CETP – cholesteryl ester transferový protein; CM-R – remnantní chylomikrony; FC – volný cholesterol; TG – triacylglyceroly; HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě; LDL – lipoproteiny o nízké hustotě; sd-LDL – malé denzní LDL; VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě; SR-B1 - scavengerový receptor typu B1; HL – jaterní lipasa (Žák A. a Zeman M., 2010).

Nejvýznamnějšími metabolickými prediktory vzniku převahy sd-LDL je hypertriacylglycerolémie a zvýšená aktivita jaterní lipasy. Vztahy mezi koncentrací TAG a rozvojem *fenotypu B* velikosti LDL je částečně vysvětlen mechanismem výměny a přenosu TAG a CE. Za nízkých plazmatických koncentrací TAG existuje ekvimolární výměna CE z LDL do CM a VLDL a TAG z VLDL a CM do LDL. U hypertriacylglycerolémie dojde k převaze přenosu TAG do LDL, v LDL jsou TAG hydrolyzovány jaterní lipasou za vzniku sd-LDL.

Nejlépe prostudovanou fyziologickou funkcí částic HDL je reverzní transport cholesterolu (RCT) z membrán periferních buněk do jater. Za fyziologických podmínek částice HDL působí antitrombogenně, RCT z makrofágů arteriální stěny je prevencí vzniku pěnových buněk. Částice HDL vykazují také protizánětlivé a antioxidační účinky, které jsou zprostředkovány enzymy lokalizovanými na HDL částicích, především paraoxonasou 1(PON 1).



Obrázek 4: Elektroforetický průkaz sd-LDL

Zkratky: VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě; LDL – lipoproteiny o nízké hustotě; HDL - lipoproteiny o vysoké hustotě; Mid –střední.

3. Apolipoproteiny

Mezi apolipoproteiny patří několik skupin bílkovin označovaných velkým písmenem a římskou číslicí. Písmeno (A až M) udává, jak se dříve předpokládalo, ale dnes již není obecně akceptováno, zařazení apolipoproteinu do apolipoproteinové rodiny. Římská číslice za písmenem označuje pořadí, v jakém byl apolipoprotein eluován z chromatografické kolony (Macášek J. et al., 2011).

Apolipoproteiny zprostředkovávají řadu nezbytných biochemických kroků spojených s metabolismem LP. Funkce apolipoproteinů spočívá v aktivaci nebo inhibici enzymů, které hrají důležitou roli v přenosu lipidů mezi jednotlivými LP, v metabolické přeměně LP a také v jejich vazbě na receptory enzymů buněčných membrán periferních tkání. Některé apolipoproteiny mají také strukturální funkci, například apolipoprotein B (apoB) se podílí na stabilizaci LDL částic, apolipoprotein A-II (apoA-II) zase částic HDL. Základní charakteristiky apolipoproteinů shrnuje tabulka 2.

3.1. Apolipoprotein B-48

Apolipoprotein B-48 (apoB-48), specifická strukturální součást CM a remnantních CM (CM_r), je bílkovina složená z 2152 aminokyselin (AMK), podobná N-terminálnímu konci apoB-100, který obsahuje 4536 AMK. U člověka je apoB-48 syntetizován pouze v enterocytech. ApoB-48 mRNA vzniká post-transkripčně enzymovou deaminací, při níž je cytidin v kodónu CAA (pro glutamin) zaměněn za uracil (UAA) se vznikem stop kodónu. Tento proces je popisován jako apoB mRNA editace. Chylomikra i CM_r obsahují vždy jednu molekulu apoB-48 a tudíž koncentrace apoB-48 informuje o počtu lipoproteinových částic střevního původu (Sakai N. et al., 2003; Nakajima K. et al., 2014).

Lipoproteiny bohaté na TAG, tj. CM (obsahující apoB-48), VLDL (obsahující apoB-100) a jejich dceřiné částice (remnanty) představují významný RF aterotrombotických kardiovaskulárních chorob, který je nezávislý na koncentracích celkového cholesterolu (TC, total cholesterol), TAG, LDL-C i HDL-C (Nakajima K. et al., 2014). Lipoproteiny bohaté TAG (TRL, triglyceride rich lipoproteins) jaterního (VLDL a IDL) a střevního (CM a CM_r) původu kompetují o stejný lipolytický systém – lipoproteinovou lipasu (LPL) kosterního svalstva a tukové tkáně i receptory – LDL receptor (LDL-R) a CM receptor (LRP, LDL receptor related protein) vychytávající remnantní částice (IDL a CM_r) v játrech.

Zvýšené koncentrace apoB-48 jsou rizikovým faktorem aterosklerotických kardiovaskulárních komplikací (především ICHS a ne-embolizačních mozkových cévních příhod) nezávislými na koncentracích TC, LDL-C, TAG a HDL-C u diabetiků i non-diabetiků, u dětí i dospělých (Alipour A. et al., 2012; Mori K. et al., 2013). Dále byly popsány u diabetické nefropatie, konečného stádia onemocnění ledvin (Hayashi T. et al., 2008), obezity a metabolického syndromu (Kinoshita M. et al., 2009; Masuda D. et al., 2014).

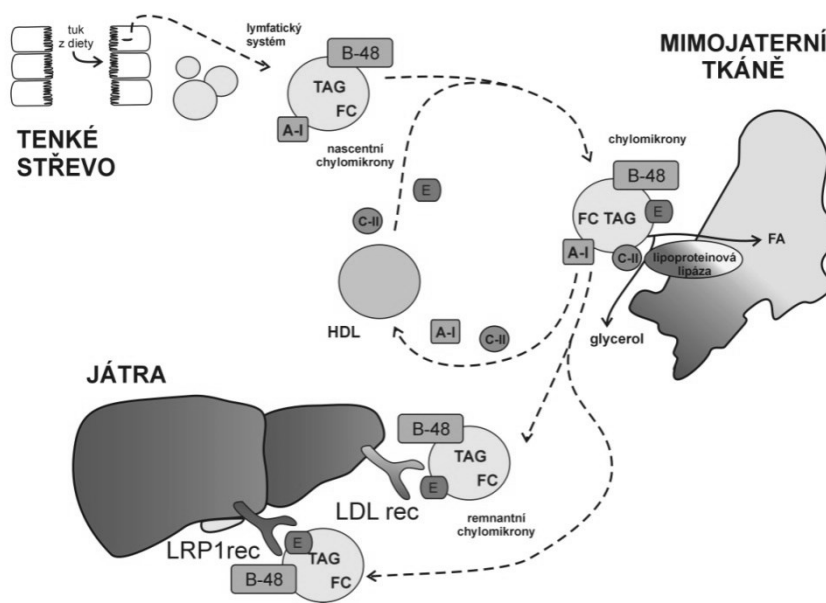
Tabulka 2: Základní charakteristiky apolipoproteinů

Apo	Hlavní LP třída	Místo syntézy	Mr (kDa)	Koncentrace (g/l)	Funkce
A-I	HDL _{2,3}	játra, střevo	28,5	0,9-1,6	transportní, vazba na HDL-receptor, aktivace LCAT
A-II	HDL ₃	játra	17,4	0,25-0,50	transportní, aktivace HL
A-IV	CM, HDL _{2,3}	játra, střevo	45,0	< 0,05	RCT, aktivace LCAT, absorpce exogenních TAG a tvorba CM
A-V	VLDL, CM		39,0	NA	aktivace lipolýzy, vazba Lp na plazminogen
B-100	VLDL, LDL	játra	512,7	0,60-1,20	transportní, vazba na LDL-R
B-48	CM	střevo	241	0-0,10	transportní
C-I	CM, VLDL	Játra, nadledviny	6,6	0,05-0,06	aktivace LCAT, inhibice vazby apoE na LDL-R, inhibice CETP
C-II	CM, VLDL	játra, střevo	8,8	0,03-0,05	aktivace LPL
C-III ₀₋₃	CM, VLDL	játra, střevo	8,7	0,10-0,14	inhibice LPL, inhibice i vazby apoE z TRLa LDL-R
D	HDL ₃	ledviny, pankreas, střevo, mozek, varlata, nadledviny	29,0-33,0	0,04-0,07	aktivace RCT a CETP
E	CM, IDL	játra, periferní tkáň	34,1	0,02-0,08	vazba CM na LRP, vazba LDL a IDL na LDL-R
Apo(a)	Lp(a)		250-800	0-2,0	inhibice aktivace plazminogenu
H	HDL		54,0	NA	aktivace LPL

Zkratky: apo – apolipoprotein; HDL – lipoprotein o vysoké hustotě; CM – chylomikrony; VLDL – lipoprotein o velmi nízké hustotě; LDL – lipoprotein o nízké hustotě; LCAT – lecitin:cholesterolacyltransferasa; RCT – reverzní transport cholesterolu; LRP – receptor related protein (CM receptor); CETP – transferový protein esterů cholesterolu; TAG – triacylglycerol; NA – nejsou dostupná data; TRL – lipoproteiny bohaté na TAG; HL – jaterní lipasa; LPL - lipoproteinová lipasa; Mr – relativní molekulová hmotnost (Macásek J. et al., 2011).

4. Metabolismus lipoproteinů

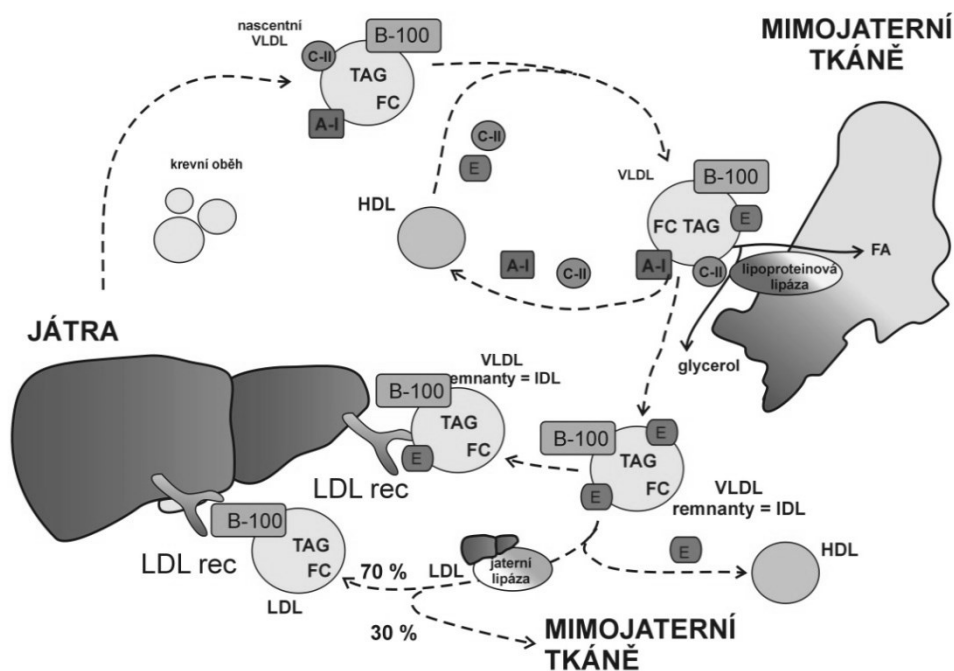
Transport lipidů v krevním oběhu prostřednictvím LP souvisí s jejich metabolickými přeměnami. Dopředný transport cholesterolu lze podle jeho zdroje rozdělit na exogenní a endogenní metabolickou cestu. Exogenní cesta začíná inkorporací dietních lipidů do nově sestavovaného CM v enterocyty (Obrázek 5). Triacylglyceroly v CM jsou hydrolyzovány pomocí lipoproteinové lipasy (LPL), hlavně v tukové a svalové tkáni, a remnantní částice jsou vychytávány játry.



Obrázek 5: Metabolismus chylomikronů

Zkratky a vysvětlivky: FA – mastné kyseliny; FC – volný cholesterol; TAG – triacylglyceroly; HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě; LRP - protein příbuzný LDL-receptoru; rec – receptor; apolipoproteiny jsou znázorněny obdélníkovými rámečky; (upraveno podle Vecka M., 2015).

Endogenní metabolická cesta analogicky začíná formováním částic VLDL v hepatocytech a metabolizací TAG. Vzniklé remnanty (IDL) jsou většinou dále hydrolyzovány na částice LDL, které jsou internalizovány v jaterních i mimojaterních tkáních pomocí LDL receptoru (Obrázek 6).



Obrázek 6: Metabolismus VLDL

Zkratky a vysvětlivky: FA – mastné kyseliny; FC – volný cholesterol; TAG – triacylglyceroly; HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě; IDL – lipoproteiny o střední hustotě; LDL – lipoproteiny o nízké hustotě; VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě; rec – receptor; apolipoproteiny jsou znázorněny obdélníkovými rámečky; (upraveno podle Vecka M., 2015).

Reverzní transport cholesterolu (Obrázek 7) začíná tvorbou nascentních částic HDL v játrech nebo ve střevě. Dalším přísunem cholesterolu a PL z buněčných membrán (např. pomocí ATP-dependentního kazetového transportéru A1; ABCA1) je vytvořena částice HDL, která může dále pomocí ABCG1, scavengerového receptoru typu B1 (SR-B1) či pasívní difúzí přijímat cholesterol z buněk. Reverzní transport cholesterolu je přímo dokončen vychytáváním částic HDL játry nebo nepřímo přesunem cholesterolu z HDL do VLDL, které jsou nakonec také internalizovány hepatocyty.

5. Význam lipidů v patogenezi vybraných onemocnění

Poruchy lipidového metabolismu charakterizované kvantitativní změnou plazmatických lipidových parametrů (dyslipidémie, hyperlipoproteinémie) patří k nejvýznamnějším RF kardiovaskulárních komplikací. Hyperlipoproteinémie se podílí na rozvoji aterosklerózy, MetS, DM 1. i 2. typu, onemocnění ledvin či malnutričních stavů.

Dietní složení a metabolismus FA ovlivňují nejen IR, aterogenní dyslipidemii či další složky MetS, ale také proces karcinogeneze. Společným pojítkem mezi IR, DM a vznikem nádorových onemocnění může být změna metabolismu FA, především syntéza FA *de novo* (Vigneri P. et al., 2009).

5.1. Ateroskleróza a kardiovaskulární onemocnění

Hlavní příčinou KVO je ateroskleróza charakterizovaná místní akumulací lipidů, dalších komponent krve a fibrózní tkáně v arteriální intimě, provázená změnami v médii cévní stěny. Vyvíjí se jako chronický zánět, který se projevuje nadměrnou proliferativní odpovědí intimy a médie tepen na různé podněty. Progrese aterosklerózy se podílí na vzniku orgánových změn, které následně způsobují závažné komplikace, jako jsou ICHS, ischemická choroba dolních končetin (ICHDK), nebo cévní mozková příhoda (CMP). Mezi první klinické projevy ischemických onemocnění patří infarkt myokardu (IM). Vznik aterosklerózy, stejně jako její rychlejší progrese do dalších oblastí, může být podmíněn vzájemným působením celé řady rizikových faktorů. Z lipidových parametrů se mezi rizikové faktory aterosklerózy řadí dyslipidémie (resp. hypercholesterolémie), zvýšené koncentrace lipoproteinu (a), apoB a snížené koncentrace apoA-I.

Míra kardiovaskulárního rizika by ovšem neměla být posuzována pouze na základě konvenčních RF, jako jsou plazmatické koncentrace HDL-C a LDL-C. Pro lepší predikci RF rozvoje aterosklerózy je potřeba lipoproteinové částice charakterizovat také kvalitativně a určit tak jejich strukturní a funkční vlastnosti. Částice LDL i HDL představují heterogenní skupinu LP, které mají na základě poměru proteiny/lipidy odlišnou hustotu a velikost. Pomocí systému Lipoprint® můžeme částice LDL podle velikosti rozdělit na sedm subpopulací a částice HDL na deset - velké (HDL1-HDL3), střední (HDL4-HDL7) a malé denzní (HDL8-HDL10). Největší aterogenní potenciál mají sd-LDL (subpopulace 3-7), které velice snadno podléhají oxidaci a tím se podílejí na rozvoji aterosklerotického poškození endotelu.

Pohled na antiaterogenní a antioxidantní působení částic HDL není jednotný, nicméně převažuje názor, že protektivně působí malé denzní HDL, které jsou lepšími akceptory cholesterolu než velké, na cholesterol bohaté částice HDL (Dušejovská M. et al., 2018; (Movva R. et al., 2008).

5.2. Metabolický syndrom

Metabolický syndrom v sobě zahrnuje rizikové faktory uplatňující se v patogenezi jak ICHS, tak i DM 2. typu. Patří mezi ně viscerální obezita, porušená glukózová tolerance, aterogenní dyslipidémie a arteriální hypertenze. Společným jmenovatelem je inzulínová rezistence (Alberti K. G. et al., 2006).

Nejen IR, ale také aterogenní dyslipidemii a další složky MetS ovlivňuje dietní složení a metabolismus FA. Jednotlivé složky MetS jsou variabilně ovlivňovány SFA, MUFA a PUFA řady n-3 a n-6, pravděpodobně prostřednictvím jejich účinků na plazmatické lipidy, krevní tlak, sekreci inzulínu a jeho účinek na cílové tkáně (Norde M.M. et al. 2018; Králová Lesná I. Et al., 2013). Nezanedbatelný vliv na složky MetS mají také *trans* izomery FA (Lottenberg A.M. et al., 2012). Profily FA jednotlivých tříd lipidů, zejména ty, které jsou obsaženy v CE a PL, odrážejí jednak dietní příjem FA během několika týdnů, tak i metabolismus FA, tj. syntézu SFA, desaturační a elongační procesy či enzymatickou (β -oxidace) i neenzymatickou (lipoperoxidace) degradaci.

Profily FA u MetS jsou charakterizovány zvýšeným obsahem SFA (zejména kyseliny palmitové), kyselin palmitolejové, γ -linolenové a dihomo- γ -linolenové, doprovázené sníženou koncentrací kyseliny linolové. Tyto změny souvisí se zvýšenou aktivitou D9D a D6D spolu s nižší aktivitou D5D (Warensjö E. et al., 2005; Žák A. et al., 2007; Paillard F. et al., 2008; Kawashima A. et al., 2009; Mayneris-Perxachs J. et al., 2014).

5.3. Konečné stádium onemocnění ledvin

Pacienti v konečném stádiu onemocnění ledvin (ESRD, end-stage renal disease) jsou dependentní na náhradě funkce ledvin, převážně hemodialýze (HD), která přispívá k rozvoji řady patofyziologických dějů, které vedou ke zvýšení OS, chronické zánětlivé odpovědi a progresi aterosklerotických změn. Tyto procesy vedou k rozvoji a manifestaci kardiovaskulárních komplikací. Přehled konvenčních a nových RF, které se podílejí na etiopatogenezi aterosklerotických změn u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, podává tabulka 3.

Tabulka 3: Konvenční a nové rizikové faktory podílející se na etiopatogenezi aterosklerotických změn u pacientů s chronickým onemocněním ledvin

Konvenční rizikové faktory	Nové rizikové faktory
Arteriální hypertenze	Chronický (subklinický) zánět
Hypercholesterolémie (elevace LDL-C)	Uremické toxiny (indoxyl-sulfát)*
Diabetes mellitus	ROS (malondialdehyd) a karbamylované proteiny (albumin, LDL a HDL)*
Kouření	Snížená syntéza NO
Obezita	Hyperhomocysteinémie
Věk (ženy 55 let a více, muži 45 let a více)	Sekundární dyslipidemie podmíněná CKD
Pohlaví (ženy < muži)	Porucha kalcio-fosfátového metabolismu
Pozitivní rodinná anamnéza (výskyt CKD u všech příbuzných 1. stupně – rodiče (u matky před 65 rokem, u otce před 55 rokem, u sourozenců a dětí)	Anemie
Metabolický syndrom	Hyperhydratace
Dietní návyky (↑ příjem proteinů)	Albuminurie

*Zkratky a vysvětlivky: ROS – reaktivní formy kyslíku, LDL-C – low density lipoprotein cholesterol, HDL-high density lipoprotein, NO – oxid dusnatý; CKD – chronické onemocnění ledvin. *Indoxyl-sulfát je uremickým toxinem syntetizovaným ve střevě z bílkovin působením střevního mikrobiomu, který je indikátorem oxidačního stresu, současně je nefrotoxinem, upreguluje cytoadhezni molekuly a inhibuje proliferaci endotelu. Malondialdehyd je vedlejším produktem peroxidace polynenasycených mastných kyselin, je využíván jako marker výskytu reaktivních forem kyslíku (ROS), jeho hladina bývá pravidelně zvýšená u pacientů s CKD. LDL modifikovaná malondialdehydem, je považována za indikátor koncentrace oxidovaného LDL. Karbamylované proteiny (albumin, LDL, HDL) vznikají posttranslační modifikací proteinů prostřednictvím urey. Modifikace proteinů mění jejich strukturu, fyzikální a chemické vlastnosti, může ovlivnit jejich funkci a působit jako neoantigen, tedy indukovat tvorbu protilátek (Dušejovská M., 2017).*

Změny v lipidogramu pacientů s ESRD jsou charakterizované HTG a výrazným poklesem HDL-C. Ve VLDL je nalézána přítomnost apoB-48, který se fyziologicky vyskytuje pouze v CM. Vzestup TAG je spojen s poklesem HDL, které zároveň obsahují jejich větší podíl. LDL mívají pacienti často ve fyziologickém rozmezí nebo snížené s přesunem k sd-LDL. Dále bývá dyslipidemie modifikována u pacientů s vyjádřeným nefrotickým syndromem nebo thyreopatií jako přidruženými komorbiditami (sekundární dyslipidemie). Koncentrace apoC-II mají klesající trend, a naopak koncentrace apoC-III stoupající. U pacientů s ESRD bývají rovněž pozorovány zvýšené plazmatické koncentrace Lp(a), které korelují s chronickým zánětem (Žák A. a Zeman M., 2010). V neposlední řadě se u pacientů s ESRD uplatňuje tzv. cholesterolový paradox. Zatím co

u populace s normální funkcí ledvin koreluje kardiovaskulární mortalita pozitivně s koncentrací TC, u pacientů s ESRD je tomu naopak.

5.4. Chronická pankreatitida a karcinom pankreatu

V patogenezi chronické pankreatitidy (ChP) i karcinomu pankreatu (KP) se uplatňuje také, mimo jiných faktorů, zvýšený OS a snížení antioxidační obrany organismu. Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou produkovány endogenně působením pankreatického renin-angiotenzinového systému nebo exogenně např. působením xenobiotik. Dalším důležitým faktorem pro vznik ChP je etanol, který je metabolizován oxidativní nebo neoxidativní cestou. Oxidace etanolu katalyzovaná alkoholdehydrogenasou vede ke vzniku acetaldehydu a kyseliny octové, působením cytochromu P4502E1 (při vysoké koncentraci etanolu) vznikají ROS. Oxidační stres přispívá k destabilizaci lysozomálních membrán vedoucí k cytotoxicitě a spuštění autodestrukční enzymové kaskády (Kodydková J. et al., 2013). Neoxidativní dráha metabolismu etanolu vede ke vzniku etylesterů mastných kyselin (FAEE, fatty acid ethyl esters). Vysoké koncentrace FAEE působí aktivaci trypsinogenu a několika mechanismy zvyšují intracelulární koncentraci Ca^{2+} , navíc intracelulární koncentraci Ca^{2+} nepřímo zvyšují FA s dlouhým řetězcem. Zvýšená intracelulární koncentrace kalciových kationtů poškozuje buňku iniciací a potenciací mechanismů vedoucích k její nekróze. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem poškozují mitochondriální metabolismus; důsledkem tohoto poškození je inhibice syntézy ATP v mitochondriích, což sekundárně inhibuje činnost energeticky náročných kalciových pump v plazmatické membráně (plasma membrane calcium ATPase pump, PMCA) a v endoplasmatickém retikulu (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase pump, SERCA), které udržují nízké koncentrace kalciových kationtů intracelulárně (Criddle D. N. et al., 2006).

Mnohé studie prokázaly, že příjem tuku a SFA je asociován s rizikem vzniku celé řady onemocnění, včetně onkologických (Howe G. R. a Burch J. D., 1996; Stolzenberg-Solomon R. Z et al., 2002; Thiébaud A. C. et al., 2009). Vysoký příjem PUFA řady n-6, zvláště kyseliny linolové, zvyšuje riziko vzniku nádoru trávicího traktu (kolorektální karcinom, KP), karcinomu prsu a prostaty, zatímco PUFA řady n-3 působí proti vzniku nádorových onemocnění (Berquin I.M. et al., 2008). Obecně lze říci, že PUFA n-6 podporují proliferaci tumoru, invazivitu, metastazování a obecně reakci organismu (zánětlivou, imunitní atd.), kdežto PUFA řady n-3 působí opačně (Wendel M. a Heller A. R., 2009).

6. Oxidační stres a chronický zánět

Oxidační stres a chronický zánět hrají významnou úlohu v patogenezi celé řady onemocnění, jako je ateroskleróza, KVO či onkologická onemocnění. Zvýšený OS je výsledkem nerovnováhy mezi produkcí RONS a/nebo nedostatečnou kapacitou antioxidačního systému.

Chronický zánět se vyznačuje infiltrací mononukleárních buněk imunitního systému (makrofágů, lymfocytů) a destrukcí tkání, která je především způsobena přetrvávající produkcí zánětlivých buněk v důsledku selhání reparace tkání, jež vedou k angiogenezi a fibróze tkáně.

Při OS poškozují ROS buněčné makromolekuly a jejich funkce, vedou k metabolickým dysregulacím a ovlivňují buněčnou signalizaci. Všechny tyto změny se uplatňují v patogenezi chronického zánětu, včetně vaskulárního mikrozánětu. Mimo ROS jsou buněčnými mediátory zánětu produkty AA uvolněné z PL buněčných membrán (PG, lipoxiny, leukotrieny). Oxidační stres se velmi významně podílí na rozvoji endotelové dysfunkce, charakterizované zhoršením jeho vazodilatačních a vazokonstrikčních schopností spojených s prozánětlivou a protrombogenní aktivací. Na akcentaci OS a subklinického mikrozánětu se podílejí také aktivované neutrofily a monocyty produkující RONS. Chronický mikrozánět a OS spolu s vysokými koncentracemi LDL jsou hlavní příčinou endoteliální dysfunkce a rozvoje aterosklerotického plaku (Štípek et al., 2000).

6.1. Oxidačně modifikované lipidy

Z lipidů jsou k oxidativnímu poškození náchylné především PUFA (kyseliny linolová, linolenová či arachidonová), které jsou součástí fosfolipidů biologických membrán a plazmatických lipoproteinů. Proces lipoperoxidace, či lipooxidace, je radikálová řetězová reakce probíhající v několika krocích. Proces oxidativního poškození lipidů je iniciován odštěpením atomu vodíku z řetězce FA (např. účinkem $\bullet\text{OH}$) za vzniku volného radikálu FA, u kterého následně dochází k přesmyku dvojně vazby za vzniku konjugovaného dienu. Konjugované dieny dále reagují s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu, který se vyznačuje vysokou reaktivitou a je schopen odštěpit vodíkový atom z další FA a tím z ní vytvořit nový radikál.

Důsledkem lipoperoxidace buněčných membrán může být změna jejich fluidity, inaktivace membránových receptorů nebo enzymů, což vede ke změně fyziologických funkcí membrány (Štípek S. et al., 2000).

Zánětlivý proces je také potencován produkty metabolismu kyseliny arachidonové, tzv. eikosanoidy (prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny). Účinkem aktivované fosfolipasy se z membrán PL uvolní kyselina arachidonová, která je dále metabolizována cyklooxygenasovou nebo lipooxygenasovou cestou. Cyklooxygenasová cesta vede k tvorbě prostaglandinů, tromboxanů. Účinkem lipooxygenasy neutrofilů lipooxygenasovou cestou vzniká například HETE, která je konvertována na společnou skupinu leukotrienů.

6.1.1. Dysfunkční HDL

Dysfunkční částice HDL vznikají působením oxidačního stresu a/nebo subklinického mikrozánětu. Modifikací proteinové a lipidové složky dochází jak ke změně struktury, tak i funkce částic, čímž HDL ztrácejí své protetikvní účinky a stávají se prozánětlivými. Vlivem zánětu a OS se v HDL mohou akumulovat oxidované lipidy, což následně vede k inhibici antioxidačních enzymů lokalizovaných na HDL (PON 1) a k strukturální modifikaci apoA-I. Tím HDL ztrácejí schopnost RCT přes ABCA 1 transportér a zároveň podporují vznik ox-LDL a vaskulárního zánětu (Dodani S. et al., 2009). Během zánětu mohou být dále částice HDL obohacovány o sérový amyloid A (SAA), který indukuje vazbu proteoglykanů na arteriální stěnu.

6.1.2. Oxidačně modifikované LDL

Působením reaktivních forem kyslíku na částice LDL dochází k jejich lipoperoxidaci, jejímž výsledkem je vznik mm-LDL a ox-LDL, které mají jednu z klíčových rolí v iniciaci aterosklerotického procesu. Vlastnosti mm-LDL a ox-LDL shrnuje tabulka 4.

Vlivem volných kyslíkových radikálů dochází k oxidaci zejména dvojných vazeb v PUFA (přeměna PUFA a pentadienového uspořádání dvojných vazeb na konjugované dieny) a dále cholesterolu a fosfolipidů na molekule LDL. Apoprotein B se rozpadá na několik menších fragmentů. Oxidace LDL lipoproteinů probíhá v arteriální stěně při interakci LDL s monocyty/makrofágy, endoteliemi, buňkami hladkého svalstva, T lymfocyty a komponenty mezibuněčné matrix. Oxidované LDL jsou pohlceny makrofágy pomocí tzv. scavengerového receptoru a dále přes vlastní ox-LDL receptor. V důsledku akumulace ox-LDL je makrofág transformován na tzv. pěnovou buňku.

Pěnové buňky migrují mezi buňky endotelu a dochází v nich k další akumulaci lipidů za vzniku tzv. lipidních proužků. Kromě toho poškozují oxidované LDL přímo endotelie, v důsledku čehož jsou z nich více uvolňovány růstové faktory. Díky tomu se povrch endotelu stává chemotaktickým. Oxidaci snáze podléhají malé LDL s vysokou hustotou než větší LDL, které obsahují větší množství antioxidantů (Hoogeveen R. C. et al., 2007).

Tabulka 4: Vlastnosti minimálně modifikovaných a oxidačně modifikovaných částic LDL

Charakteristika/vlastnost	mm-LDL	ox-LDL
zdroj intracelulární akumulace lipidů (pěnové buňky)	-	+
katabolismus prostřednictvím SR-B1	-	+
přítomnost reaktivních aldehydů (MDA, 4-HNE)	±	+
katabolismus cestou LDL-receptorů	+	-
stimulace exprese a syntézy informačních cytokinů	+	-
inhibice syntézy NOS	-	+
imunogenní vlastnosti	-	+
cytotoxicita pro endotelové buňky a hladké svalové buňky	-	+
chemotaxe leukocytů	-	+

Zkratky: mm-LDL – minimálně modifikované lipoproteiny o nízké hustotě; ox-LDL – oxidačně modifikované lipoproteiny o nízké hustotě; SR-B1 – scavengerový receptor typu B1; MDA – malondialdehyd, 4-HNE – 4 hydroxynonenal; NOS – syntasa oxidu dusnatého.

6.1.3. Konjugované dieny

Jako dieny jsou označovány uhlovodíky s dvěma násobnými vazbami v molekule. Jsou-li obě dvojně vazby odděleny pouze jedinou jednoduchou vazbou, dochází k efektu zvanému konjugace, kdy tyto 2 dvojně vazby na sebe navzájem významně působí, z čehož pro konjugované dieny (KD) plynou některé velmi specifické vlastnosti. Vlivem delokalizace elektronů vykazují KD neobyčejnou stabilitu. V řetězci FA je metylenová skupina citlivá k působení volných radikálů. Působením radikálu se z metylenové skupiny odtrhne atom vodíku a z FA se tak rovněž stává radikál. V důsledku vytržení vodíku dojde k přeskupení elektronů v řetězci FA tak, že se mezi dvěma dvojnými vazbami vytvoří vazba jednoduchá a vznikne tak konjugovaný dien. Ten snadno reaguje s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu. Peroxylový radikál je, stejně jako radikál FA, velmi

reaktivní, a tudíž dochází k neustálému opakování tohoto procesu na principu řetězové reakce (Ahotupa M. et al., 1996).

6.2. Antioxidační enzymy

Udržení oxidační rovnováhy organismů zajišťuje antioxidační systém, tvořený antioxidačními enzymy a neenzymovými antioxidanty. Mezi nejvýznamnější antioxidační enzymy patří paraoxonasa, superoxiddismutasa (SOD), katalasa (KAT), glutathionperoxidasa (GPX), glutathionreduktasa (GR), nejdůležitějším neenzymovým antioxidantem je redukovaný glutathion (GSH); (Racek J, a Holeček V., 1999).

Významným antioxidačním enzymem, který chrání lipoproteinové částice před oxidačními změnami, a působí tak proti aterosogenezi a napomáhá udržení reverzního transportu cholesterolu je PON 1.

6.2.1. Paraoxonasa 1

Paraoxonasa 1 (apolipoprotein K), systematicky aryltrifosfát: dialkylfosfohydrolasa (EC 3.1.8.1) je extracelulární kalcium dependentní enzym řadící se do genetické rodiny paraoxonas spolu s dalšími dvěma izoenzymy, s PON2 a PON3. Všechny tři izoformy jsou kódovány geny lokalizovanými na dlouhém raménku chromozomu 7 a mají velmi podobné nukleotidové i aminokyselinové složení, liší se však místem, kde jsou tvořeny a kde působí, a též aktivita vůči různým substrátům je rozdílná. Jako první byla identifikována PON 1, která je nejvíce studovanou a prozatím i nejvíce prostudovanou izoformou PON.

Izoforma PON1 (sérová paraoxonasa) je syntetizována v játrech a dále vylučována do krevního oběhu, kde se prostřednictvím apoA-I pevně váže N-koncovým hydrofobním úsekem na částice HDL (Deakin S.P. a James R.W., 2004). Peptid je zanořený do plazmatické membrány exprimujících buněk a je orientovaný do extracelulárního prostoru. Orientace paraoxonasy směrem k extracelulárnímu prostoru, má vliv na potenciální ochranu buněk před oxidovanými LDL a jinými oxidovanými lipidy. V krvi je lokalizovaná na subfrakci HDL, která obsahuje apoA-I a apoJ (clusterin).

7. Význam stanovení konvenčních lipidových parametrů

Základními ovlivnitelnými RF KVO jsou koncentrace celkového a LDL cholesterolu. Změny koncentrací plazmatických lipidů a LP (včetně jejich složení) jsou spojeny s chorobnými stavy, jako jsou dyslipoproteinémie, nebo s klinickými komplikacemi aterosklerózy (např. ICHS, ICHDK) či DM.

Relativní riziko ICHS stoupá s koncentrací LDL-C, přičemž v koncentračním pásmu LDL-C od 1,0 do 4,9 mmol/l se relativní riziko ICHS zvýší téměř čtyřikrát. Je známo, že pouze 25 % osob se nachází v kategorii vysokého rizika (Greenland P. et al., 2001). Ve skupině pacientů středního věku (<55 let bez předchozí anamnézy ICHS) po 1. atace akutního IM je 10 % charakterizováno vysokým rizikem, 20 % středním rizikem a zbývajících 70 % spadá do kategorie nízkého rizika, kdy není potřeba indikace hypolipidemické léčby (Akosah K.O. et al., 2003).

Vliv koncentrace HDL-C na odhad kardiovaskulárního rizika je malý, ale nezanedbatelný na upřesnění rizika. V posledních letech se jako o RF ICHS hovoří také o TAG. Je známo, že hypertriacylglycerolémie ovlivňuje složení a tím také strukturu a funkci LP a má významný vztah k IR.

Pro upřesnění diagnózy bývá u přesně definovaných případů indikováno stanovení dalších lipidových parametrů, jako je apoB-100 (indikátor celkového počtu aterogenních částic – VLDL, IDL a LDL), apoA-I (ukazatel kapacity RCT), apoA-II (poměr apoA-I/apoA-II odráží pokles kapacity RCT) či Lp(a), jako samostatného RF ICHS a dalších komplikací aterosklerózy. Stanovením koncentrace apoB-100 je možné snížit chybu při odhadu zvýšeného kardiometabolického rizika.

8. Význam pokročilé lipidomiky

Lipidomika se zabývá identifikací a kvantifikací různých lipidových metabolitů, tzv. lipidomu, v biologickém materiálu. Lipidom představuje veškeré molekulární druhy lipidů nacházející se v buňkách a tkáních organismu. Analýza lipidomu spolu s dalšími vědními disciplínami (genomika, proteomika, metabolomika) přispívá ke studiu struktury lipidových metabolitů a jejich interakcí s dalšími sloučeninami za fyziologických a patologických stavů. Poznatky získané studiem lipidomu hrají důležitou roli při objasňování vzniku a průběhu nemocí na molekulární úrovni.

Pokroky v analytické chemii a přístrojovém vybavení umožňují stanovení velkého množství biochemických parametrů, což ovšem může komplikovat interpretaci získaných výsledků v biologickém kontextu. Vzhledem k tomu, že se pracuje s velkými soubory dat, je pro správnou interpretaci lipidomické analýzy vhodné použít mnohorozměrnou statistickou analýzu, která umožňuje najít zákonitosti vztahů mezi jednotlivými proměnnými. Mezi základní metody mnohorozměrné statistiky patří diskriminační a shluková (clusterová) analýza.

8.1. Cílená analýza lipidových parametrů

Mimo již zmíněných konvenčních lipidových parametrů krevní plazmy/séra, je možné kvalitativně i kvantitativně identifikovat řadu biomolekul souvisejících s lipidovým metabolismem v různých tělesných tekutinách či tkáních jednotlivých orgánů.

Pomocí chromatografických metod je možné vyšetřit zastoupení FA jednotlivých lipidových tříd (CE, TG, PL, resp. PC) či volných (neesterifikovaných) FA, zastoupení sterolů nebo žlučových kyselin. Diskontinuální elektroforézou na polyakrylamidovém gelu lze stanovit subpopulace částic LDL i HDL, detailní analýzu složení jednotlivých LP je možné provést po jejich ultracentrifugační separaci v hustotním gradientu.

Mezi další cílené analýzy lipidů patří posouzení antioxidační kapacity na základě měření koncentrací oxidačně modifikovaných lipidů (ox-LDL, KD) nebo aktivit antioxidačních enzymů (PON).

8.2. Uplatnění pokročilých metod statistické analýzy

K nejvýznamnějším statistickým metodám patří regresní analýza, která umožňuje odhadovat hodnotu závisle proměnné (náhodné veličiny) na základě znalosti nezávisle proměnných (regresorů). Pomocí jednoduché regresní analýzy lze najít funkční závislost

náhodné veličiny na jednom regresoru, vícenásobná (mnohorozměrná) regrese umožňuje najít model funkční závislosti na několika regresorech. Následkem velkého počtu regresorů není mnohdy možné pro některé parametry zamítnout nulovou hypotézu. Jednodušší model lze získat vypuštěním některých regresorů metodami postupného výběru. Najít pouze významné regresory lze metodou vzestupného výběru (forward selection) - postupné přidávání regresorů, dokud je model stále ještě významný (i); sestupného výběru (backward selection) – spočítá se model se všemi regresory a následně se postupně vyřazuje regresor, který nejméně přispívá k vysvětlení závisle proměnné (ii); krokovou regresní analýzou (stepwise regression) – vzestupný výběr je v každém kroku kombinován s pokusem o zjednodušení pomocí sestupného výběru (iii).

Další metodou mnohorozměrné statistické analýzy je diskriminační analýza, která popisuje závislost mezi skupinou nezávisle proměnných (diskriminátorů) a jednou závisle proměnnou. Smyslem diskriminační analýzy je odhalit model, který pomůže zařadit jednotlivé sledované objekty do některé z již existujících skupin.

S diskriminační analýzou úzce souvisí analýza shluková. Smyslem shlukové (clusterové) analýzy je seskupit/rozdělit sledované objekty z vícerozměrného datového souboru do homogenních skupin (shluků, clusterů). V určitém clusteru se nachází pozorování (skupina objektů), která si jsou v určitém smyslu podobná a jsou odlišná od pozorování v jiných clusterech. Pomocí clusterové analýzy lze například najít shluky mezi určitými sledovanými analyty a rozlišit vzorky probandů z kontrolní skupiny a pacientů s různými chorobami neboli poruchami metabolismu.

9. Hypotézy a cíle práce

Hypotéza: lipidomická analýza může přispět k upřesnění diagnostiky, pochopení patogeneze a léčby některých onemocnění.

Cíle práce:

- 1/ multivariační analýzou zjistit, které FA jsou asociovány s jednotlivými antropometrickými, klinickými a laboratorními ukazateli u nemocných s metabolickým syndromem;
- 2/ analyzovat složení FA u MetS a kontrolní skupiny pomocí clusterové analýzy a charakterizovat nemocné nezávisle na klinických a laboratorních ukazatelích;
- 3/ analyzovat u osob se zvýšeným kardiometabolickým rizikem asociaci zvýšených koncentrací apolipoproteinu B-48 (apoB-48) s laboratorními a klinickými ukazateli;
- 4/ s užitím multivariační lineární diskriminační analýzy stanovit složení FA plazmatického fosfatidylcholinu, které odlišuje nemocné s chronickou pankreatitidou od zdravých kontrol;
- 5/ stanovit asociaci složení FA hlavních lipidových tříd plazmy s nutričním stavem, stagingem a přežitím u nemocných s karcinomem pankreatu;
- 6/ s užitím multivariační lineární diskriminační analýzy zjistit možnosti odlišení nemocných s karcinomem pankreatu od osob s chronickou pankreatitidou stanovením vybraných markerů lipoperoxidace a spektra antioxidačních enzymů;
- 7/ u pacientů v konečném stádiu onemocnění ledvin, kteří přežili 5 let na hemodiafiltraci, sledovat vzájemný vztah mezi poruchami lipidového metabolismu a změnou velikosti lipoproteinových částic LDL a HDL.

10. Materiál a metody

10.1. Studované patologické stavy

Vybrané lipidové parametry byly sledovány u pacientů s různými druhy onemocnění, vždy v porovnání s kontrolní skupinou zdravých osob. Do studií byli zařazeni pacienti s MetS, KP, ChP a pacienti s ESRD. Přehled jednotlivých studií podává tabulka 5. U osob se zvýšeným kardiometabolickým rizikem byly porovnány klinické, antropometrické a biochemické ukazatele osob s koncentrací apoB-48 $\geq 7,9$ mg/l se skupinou, jejíž koncentrace apoB-48 byly pod touto hranicí ($< 7,9$ mg/l).

Tabulka 5: Přehled studovaných onemocnění a provedených studií

Skupina pacientů	N (M/Ž)	Literatura
MetS	300 (152/148)	Zeman M. (Metab Syndr Relat Disord, 2017), <i>Příloha 7</i>
	166 (98/68)	Žák A. (Physiol Res, 2014), <i>Příloha 4</i>
	354 (166/188)	Staňková B. (Klin Biochem Metab, 2016), <i>Příloha 6</i>
	40 (20/20)	Vávrová L. (Obesity Facts, 2013), <i>Příloha 2</i>
KP	68 (36/32)	Vávrová L. (Klin Biochem metab, 2018), <i>Příloha 9</i>
	84 (47/37)	Macášek J. (Nutr Cancer. 2012), <i>Příloha 1</i>
	50 (40/10)	Kodydková J. (Pancreas, 2013), <i>Příloha 3</i>
CHP	96 (70/26)	Zeman M. (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2016), <i>Příloha 5</i>
	57 (35/22)	Dušejevská M. (Curr Vasc Pharmacol, 2018), <i>Příloha 8</i>
apo B-48 $\geq 7,9$ mg/l	112 (60/52)	Staňková B. (Fol Biol, 2019), <i>Příloha 10</i>
apo B-48 $< 7,9$ mg/l	108 (44/64)	

Zkratky: MetS - metabolický syndrom; KP - karcinom pankreatu; ChP- chronická pankreatitida; ESRD - konečné stádium onemocnění ledvin.

Všechny studie, které byly podkladem pro tuto práci, byly schváleny etickou komisí 1. LF UK a VFN Praha. Všechny osoby zařazené do těchto studií byly informovány o průběhu a cílech studie a podepsaly informovaný souhlas. Všem vzorkům byly přiřazeny unikátní anonymizační kódy, které byly dekodovány až po skončení pokusu.

Metabolický syndrom

Diagnostika MetS probíhala na základě diagnostických kritérií Mezinárodní diabetologické federace (Alberti K.G. et al., 2005). Aby pacienti byli zařazeni do studie, museli splňovat kritérium abdominální obezity (obvod pasu ≥ 94 cm u mužů a ≥ 80 cm u žen) a dále alespoň další dvě z následujících 4 kritérií:

- I) koncentrace TAG $\geq 1,7$ mmol/l, nebo léčba tohoto onemocnění;
- II) koncentrace HDL-C $<1,03$ mmol/l u mužů a $<1,29$ mmol/l u žen;
- III) zvýšený krevní tlak (STK ≥ 130 nebo DTK ≥ 85 mm Hg), nebo diagnostikovaná a léčená hypertenze;
- IV) zvýšená glykemie nalačno (≥ 5.6 mmol/l) nebo diagnostikovaný DM typu 2.

Vylučovacími kritérii pro zařazení do studie byla suplementace PUFA či antioxidanty, nadměrná konzumace alkoholu (> 30 g/den), substituční hormonální léčba, nádorová onemocnění, či chemoterapie, akutní zánětlivá onemocnění, jaterní cirhóza, DM 1. typu, onemocnění jater a ledvin, mikroalbuminurie.

Karcinom pankreatu

Diagnóza karcinomu pankreatu byla u všech pacientů potvrzena buďto histologicky z pankreatického resektátu nebo endoskopickou aspirační cytologií. Staging byl zhodnocen pomocí TNM systému a kritérií Union Internationale Contre le Cancer and the American joint Committee on Cancer (UICC/AJCC 2002).

Vylučovacími kritérii pro zařazení do studie byla suplementace PUFA či antioxidanty, léčba fibráty či statiny, jiná nádorová onemocnění, jaterní cirhóza, dekompensovaný DM, endokrinní onemocnění, nestabilní angina pectoris, klinicky manifestovaná proteinurie.

Chronická pankreatitida

Diagnostika ChP byla založena na klinických projevech (bolest břicha, nausea/zvracení, anorexie/malnutrice, steatorhea) a potvrzena dvěma a více zobrazovacími metodami – kombinací endoskopické ultrasonografie a buďto ultrasonografie, kontrastního CT,

magnetické resonance, či endoskopické retrográdní cholangiopankreatografie. Závažnost ChP (mírná, střední, těžká) byla stanovena podle Mannheimských pankreatických zobrazovacích kritérií.

Vylučovacími kritérii pro zařazení do studie byla suplementace PUFA či antioxidanty, léčba fibráty či statiny, nádorová onemocnění, či chemoterapie, jaterní cirhóza, dekompenzovaný DM, endokrinní onemocnění, nestabilní angina pectoris, klinicky manifestovaná proteinurie. Dalšími vylučovacími kritérii byla akutní pankreatitida, endokrinní onemocnění, akutní infarkt myokardu v posledním roce, nestabilní angina pectoris, operace GIT za poslední rok či sepse v posledních 6 měsících.

Terminální renální selhání

Do studie byli zařazeni pacienti v pravidelném hemodialyzačním programu, kteří podstupovali pravidelně dialýzu v celkovém rozsahu 12-15 hodin týdně. Adekvátnost dialýzy byla vyjádřena prostřednictvím parametru on-line clearance monitoring (OCM), který je znám ihned po ukončení hemodialyzační procedury a měl by nabývat hodnot $> 1,4$. Ve sledovaném souboru byl průměrný OCM parametr $1,64 \pm 0,33$. Vylučovacími kritérii pro zařazení do studie byla endokrinopatie, těhotenství a kojení, požívání alkoholu a akutní zánětlivá onemocnění. Krev byla odebírána vždy před dialýzou. Pacienti byli nabíráni celkem dvakrát, nejprve při zařazení do studie a podruhé po pěti letech od prvního náběru. Druhého odběru se dožilo pouze 14 pacientů na hemodialýze, 10 pacientů ze souboru podstoupilo transplantaci ledviny a 34 pacientů zemřelo.

10.2. Preanalytická fáze

U všech osob zařazených do studií byly prováděny odběry krevních vzorků po celonočním lačnění (min. 10 hodin). Odebírána byla venózní krev. Podle použité analytické metody byly sledované parametry stanovovány v séru nebo plazmě. Krev byla odebírána z periferní žíly do odběrových zkumavek se separačním gelem BD Vacutainer® pro separaci séra (BD SST™ II Advances) a zkumavek BD Vacutainer® EDTA pro separaci plazmy. Plazma/sérum byla od krevních elementů oddělena centrifugací při 3500 RPM a 4°C po dobu 10 minut.

10.3. Stanovení profilu mastných kyselin

Stanovení profilu FA se skládá z několika fází, nejprve je extrahován celkový lipid ze vzorků séra metodou dle Folche modifikované Carlsonem (Folch J. et al., 1957; Carlson

L.A., 1985), poté je pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie provedena separace jednotlivých lipidových tříd – oddělí se od sebe PL, TAG a CE, následně je pomocí plynové chromatografie (GC) provedena analýza profilu FA v jednotlivých lipidových třídách dle metody popsané dříve (Tvrzická E. et al., 2002).

10.3.1. Extrakce celkového lipidu

K extrakci celkového lipidu je zapotřebí 1 ml vzorku séra (plazmy), ke kterému je přidáno 10 ml extrakční směsi dichlormethan:methanol v objemovém poměru 2:1, následně je směs 20 minut třepána. Po 20 minutách je směs přefiltrována a filtr 3x promyt 2 ml extrakční směsí. Poté jsou ke směsi přidány 4 ml redestilované vody, směs důkladně protřepána a centrifugována 5 minut při 1500 rpm. Po centrifugaci je infranatant přenesen do čisté skleněné zkumavky a vysušen při 40°C pod proudem dusíku.

10.3.2. Separace jednotlivých lipidových tříd

Separace jednotlivých lipidových tříd (PL, TAG, CE) byla provedena pomocí tenkovrstvé chromatografie. Stacionární fázi je na skleněných deskách nanosená vrstva silikagelu. Jako mobilní fáze slouží směs heptan : diethylether : ledová kyselina octová v objemovém poměru 85 : 15 : 1. V této mobilní fázi se PL nepohybují a zůstanou v místě nanosení vzorku, na startu. Neutrální lipidové třídy se od PL oddělí a putují s mobilní fází. Jednotlivé lipidové třídy jsou po ukončení chromatografie detekovány pod UV lampou při $\lambda = 366 \text{ nm}$. Následně jsou kvantitativně převedeny do označených zkumavek pro další zpracování.

10.3.3. Analýza profilu mastných kyselin

Aby jakýkoliv vzorek mohl být analyzován prostřednictvím GC, musí být vzorek těkavý. Proto je nutné převést FA transmetylací na jejich těkavé metylestery. Pro transmetylaci FA byl použit bezvodý metanolát sodný. K izolovaným lipidům byl přidán 1 ml metanolátu sodného. Vzorky PL a TAG byly pak ponechány po dobu 60 minut při laboratorní teplotě v temnu, vzorky CE byly 20 minut vařeny při 80°C. Po inkubaci (a vychladnutí u CE) byly přidány 2 ml hexanu a 2 ml 0,5N kyseliny octové. Následně byly vzorky protřepány a centrifugovány 10 minut při 2000 rpm. Po centrifugaci byl supernatant převeden do čisté zkumavky a při 40°C vysušen pod proudem dusíku. Vzorky metylesterů byly naředěny heptanem a analyzovány kapilární GC s plamenoionizační detekcí (GC 17A Shimadzu, Japonsko).

Při GC byla jako stacionární fáze použita kapilární kolona s polární zakotvenou fází DB-23; síla zakotvené fáze 0,25 μ m; vnitřní průměr 0,25mm; délka 60m (Agilent Technologies, USA). Nosným plynem byl vodík, se vstupním tlakem 53kPA. Teplota injektoru byla 250°C a teplota detektoru 260°C pro všechny analýzy. Pro jednotlivé lipidové třídy však byly použity různé teplotní programy pro jejich analýzu.

Teplotní program pro analýzu FA v TAG a PL byl následující:

- počáteční teplota 80°C – izotermicky 1 minutu,
- gradient 10°C/minutu do teploty 120°C,
- gradient 4°C/minutu do teploty 180°C,
- gradient 1°C/minutu do teploty 240°C,
- gradient 10°C/minutu do teploty 250°C - izotermicky 5 minut.

Teplotní program pro analýzu FA v cholesterollesterech:

- počáteční teplota 80°C – izotermicky 1 minutu,
- gradient 10°C/minutu do teploty 120°C,
- gradient 4°C/minutu do teploty 180°C,
- gradient 1°C/minutu do teploty 240°C,
- gradient 10°C/minutu do teploty 250°C - izotermicky 20 minut.

Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno s pomocí programu SW Clarity™ (Data Apex, ČR).

10.4. Stanovení neesterifikovaných mastných kyselin

Koncentrace NEFA byla stanovována fotometricky při 546 nm podle metody Matsubara a kol. (1983) s využitím komerčně dodávaného kitu firmy Roche Diagnostics. Měření byla prováděna na automatickém analyzátoru Cobas Mira Plus. Mechanismus stanovení popisují reakce ve schématu 1.

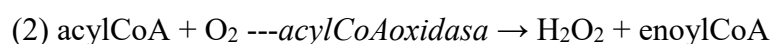
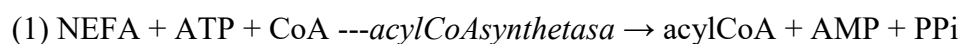


Schéma 1: Mechanismus stanovení neesterifikovaných mastných kyselin

Zkratky: NEFA - neesterifikované mastné kyseliny; ATP – adenosintrifosfát; CoA - koenzym A; AMP – adenosinmonofosfát.

10.5. Stanovení ApoB-48

Koncentrace apoB-48 byly analyzovány pomocí komerčně dodávaného ELISA setu firmy Shibayagi Co., Ltd. Jedná se o sendvičovou metodu ELISA, která využívá navázané monoklonální protilátky proti lidskému apoB-48 na stěnách mikrotitračních jamek.

Standardy nebo vzorky jsou inkubovány na mikrotitrační desce s navázanou (na stěnách jamek) monoklonální protilátkou proti apoB-48. Po 1 hodině inkubace a následném důkladném promytí se do jamek přidá biotinem konjugovaná protilátka proti apoB-48, která se opět 1 hodinu inkubuje s imobilizovaným komplexem protilátka – apoB-48. Po dalším promytí se přidá streptavidin konjugovaný s HRP (křenovou peroxidasou). Po 30 minutové inkubaci a důkladném promytí navázaný streptavidin konjugovaný s HRP reaguje po dobu 20 minut s chromogenem 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinem (TMB). Reakce se zastaví přidáním zastavovacího roztoku (0,5 M H₂SO₄) a spektrofotometricky se měří absorbance žlutého produktu při 450 nm.

Naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci apoB48. Koncentrace apoB-48 v neznámých vzorcích se stanoví pomocí standardní křivky, která se získá vynesáním absorbancí standardů oproti jejich známé koncentraci. Koncentrace apoB-48 je udávána v mg/l. Vzorky séra musí být před analýzou zředěny, používá se ředění 1 : 199.

10.6. Separace lipoproteinů a analýza lipoproteinových subfrakcí

Jednotlivé lipoproteinové třídy byly separovány preparativní ultracentrifugací (Optima™ L-100XP, Beckman Coulter) za postupně se zvyšující hustoty prostředí v pořadí VLDL, LDL a HDL (Schumaker and Puppione, 1986).

3 ml séra byly odměřeny do ultracentrifugační kyvety a výška hladiny byla na zkumavce zaznačena ryskou. Poté bylo sérum převrstveno 1,5 ml hustotního roztoku. Hustota roztoku byla volna podle separované frakce tak, aby daná frakce flotovala. Vhodné hustoty pro separaci jednotlivých lipoproteinových frakcí a hustoty použitých hustotních roztoků jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Hustotní roztoky pro ultracentrifugační separaci

Lp	Požadovaná ρ (g/ml)	Použitý hustotní roztok (g/ml)	Výsledná ρ (g/ml)
VLDL	< 1,006	1,006	1,006
LDL	1,006-1,063	1,182	1,063
HDL	1,063-1,210	1,504	1,210

Zkratky: Lp – lipoprotein; VLDL - lipoproteiny o velmi nízké hustotě; LDL - lipoproteiny o nízké hustotě; HDL - lipoproteiny o vysoké hustotě.

Centrifugační zkumavky byly pevně uzavřeny a centrifugovány ve vakuu při 38 000ot/min, při teplotě 10°C po dobu 20 hodin. Izolovaná frakce lipoproteinů byla stažena po rysku označující původní objem séra do graduované zkumavky. Následně byly jednotlivé odebrané frakce doplněny adekvátním hustotním roztokem na původní objem 3 ml a vzorky byly odeslány do Centrálních laboratoří Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze ke stanovení koncentrací TC a TAG.

Zastoupení subfrakcí LDL a HDL v séru bylo analyzováno pomocí vysokoúčinné diskontinuální gelové elektroforézy Lipoprint® LDL/HDL System (Quantimetrix, USA) s použitím diagnostických setů Lipoprint LDL/HDL Kit.

Metoda je založena na principu vertikální elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, který je umístěn ve skleněných trubičkách. Quantimetrix Lipoprint System je schopen separovat LDL a HDL subfrakce a stanovit v nich obsah cholesterolu. Lipoprint LDL Kit separuje lipoproteinové částice, které obsahují ApoB. Celkem je systém schopen oddělit 11 frakcí obsahujících apoB. Oddělí následující frakce: VLDL, IDL-A, IDL-B, IDL-C a 7 subpopulací LDL. LDL₁ a LDL₂ reprezentují velké částice, LDL₃ – LDL₇ malé denzní LDL (sd-LDL). Vyhodnocení se provádí denzitometricky pomocí programu Lipoware (Quantimetrix, USA).

10.7. Stanovení lipidových markerů oxidačního stresu

Ve studiích, které byly podkladem pro tuto disertační práci, byly stanovovány jako lipidové markery oxidačního stresu koncentrace konjugovaných dienu v precipitovaných LDL a koncentrace oxidovaných LDL částic.

10.7.1. Konjugované dieny

Koncentrace KD v precipitovaných LDL částicích byla měřena modifikovanou metodou Wielanda a kolektivu (Wieland H. a Seidel D., 1983). Vzorky séra byly ihned po odběru stabilizovány přidavkem 25 μ l 10% roztoku EDTA a analyzovány nejpozději do 2 týdnů od náběru. Nejprve byla prováděna izolace částic LDL ze séra a to pomocí precipitační metody dle Ahotupy a kolektivu (Ahotupa M. et al., 1996). Ke 110 μ l séra s EDTA byl přidán 1 ml citrátového pufru o pH = 5,05 s přidavkem heparinu (50,000 IU/l). Po smíchání byla suspenze inkubována po dobu 10 minut při pokojové teplotě a následně 10 minut centrifugována při 2800 rpm. Centrifugací byly odděleny vysrážené lipoproteiny, supernatant byl odstraněn a lipoproteiny byly znovu rozpuštěny ve 100 μ l 9% NaCl. Aby se zabránilo oxidaci LDL, je nutné, aby vysrážené lipoproteiny nezůstaly dlouho na vzduchu, proto je nutno pracovat se vzorky jednotlivě a velmi rychle.

K extrakci lipoproteinů byla použita směs chloroform-methanol. Směs byla za přerušovaného míchání inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. K separaci jednotlivých fází bylo použito 250 μ l redestilované vody. Po 10 minutách inkubace byla směs 5 minut centrifugována při 3000 rpm. Po centrifugaci bylo 800 μ l infranatantu vysušeno dusíkem a následně znovu rozpuštěno v 300 μ l cyklohexanu.

Analýza byla provedena spektrofotometricky při 234 nm. Pro výpočet koncentrace KD byl použit molární extinkční koeficient $\varepsilon = 2,95 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Koncentrace byla vyjádřena jako mmol KD na litr séra (mmol/l).

10.7.2. Oxidačně modifikované LDL

Stanovení hladiny ox-LDL částic v séru bylo provedeno prostřednictvím komerčně dodávaného ELISA kitu firmy Mercodia. Jedná se o sendvičovou metodu ELISA, která využívá myší monoklonální protilátky proti konformačnímu epitopu v oxidovaném apoB-100, jde o vazbu malondialdehydu či 9-hydroxynonenalu na epsilon aminoskupiny apoB-100.

Ve stěnách mikrotitračních buněk jsou navázány protilátky proti ox-LDL. Na tyto protilátky se v průběhu inkubace naváží molekuly ox-LDL přítomných ve vzorku séra. Po ukončení inkubace je zbytek séra odstraněno, buňky jsou opakovaně promyty a je v nadbytku přidán roztok s enzymem značenou protilátkou proti ox-LDL. Po ukončení následné inkubace, je nadbytek značené protilátky odstraněn a buňky jsou opět promyty. V dalším kroku je přidán substrát TMB pro enzym (streptavidinperoxidasa), který slouží

ke značení protilátky. Působením streptavidinperoxidasy na TMB dojde k barevné změně. Výsledná absorbance je po ukončení reakce odečtena spektrofotometricky.

Naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci ox-LDL. Koncentrace neznámých vzorků je vypočtena z kalibrační závislosti. Kalibrace je měřena vždy pro každou sadu vzorků. Hladina ox-LDL je udávána v jednotkách U/l. Vzorky séra musí být před analýzou zředěny, používá se ředění 1 : 6561.

10.8. Stanovení aktivity paraoxonasy 1

Paraoxonasa vykazuje aktivitu celkem ke třem různým druhům substrátů, tedy tři různé aktivity – arylesterasovou, laktonasovou a paraoxonasovou. V rámci provedených studií byla vždy stanovována arylesterasová aktivita, v některých případech i laktonasová aktivita PON 1.

10.8.1. Arylesterasová aktivita PON

Arylesterasová aktivita PON1 (PON-A) byla stanovována dle metody Eckersona a kolektivu (Eckerson H.W. et al., 1983), která využívá jako substrát fenylacetát. Aktivita byla měřena spektrofotometrickou kinetickou metodou. Vzorky byly měřeny v tripletu a ke každé sadě vzorků byl měřen vlastní blank. Sérum bylo před stanovením ředěno, míra ředění byla uzpůsobena druhu onemocnění.

V UV kyvetě bylo smícháno 900 μ l 20mM tris-HCl pufru o pH 8 s přídavkem 1mM CaCl_2 s 50 μ l zředěného vzorku séra. Reakce byla nastartována přidáním 50 μ l 100mM fenylacetátu. Nárůst absorbance byl sledován spektrofotometricky při 270 nm po dobu 2 minut. Nárůst absorbance je dán vzrůstající koncentrací fenolu, který se uvolňuje během rozkladu fenylacetátu. Aktivita PON-A byla počítána za použití molárního extinkčního koeficientu produkovaného fenolu, $\epsilon = 1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a vyjádřena jako U/ml séra.

10.8.2. Laktonasová aktivita PON

Ke stanovení laktonasové aktivity PON1 byla použita modifikovaná metoda dle Draganova (Draganov D.I. et al., 2000). Jako substrát pro PON-L byl zvolen dihydrocoumarin (3,4-dihydro-1-benzopyran-2-on), který je prostřednictvím PON-L přeměněn na 3-(2-hydroxy-fenyl)-propionat. Aktivita PON-L byla měřena spektrofotometrickou kinetickou metodou. Vzorky byly měřeny v tripletu a ke každé sadě vzorků byl měřen vlastní blank. V UV kyvetě bylo k 800 μ l 50 mM TRIS-HCl pufru (pH = 8, přídavek 1 mM CaCl_2) přidáno 100 μ l zředěného vzorku séra. Směs byla inkubována

po dobu 5 minut při 30°C. Poté byla reakce nastartována přidáním 100 μ l dihydrocoumarinu (o konečné koncentraci 1 mM). Po dobu 2 minut byl spektrofotometricky sledován nárůst absorpance při 270 nm. Pro výpočet aktivity PON-L byl použit molární extinkční koeficient pro 3-(2-hydroxy-fenyl)-propionat $\epsilon = 1295 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Rainwater D.L. et al., 2009). Aktivita PON-L byla vyjádřena jako U/ml sera.

10.9. Stanovení sérového amyloidu A

Koncentrace SAA byla stanovována pomocí komerčně dodávaného ELISA setu firmy Invitrogen. Jedná se o sendvičovou metodu ELISA, která využívá monoklonální protilátky proti lidskému SAA.

Ve stěnách mikrotitračních buněk jsou navázány protilátky proti SAA. Na tyto protilátky se v průběhu inkubace naváží molekuly SAA přítomných ve vzorku séra. Po ukončení inkubace je zbytek séra odstraněno, buňky jsou opakovaně promyty a je v nadbytku přidán roztok s enzymem značenou protilátkou proti SAA. Po ukončení následné inkubace, je nadbytek značené protilátky odstraněn a buňky jsou opět promyty. V dalším kroku je přidán substrát TMB pro enzym (streptavidinperoxidasa), který slouží ke značení protilátky. Působením streptavidinperoxidasy na TMB dojde k barevné změně. Výsledná absorpance je po ukončení reakce odečtena spektrofotometricky.

Naměřená absorpance je přímo úměrná koncentraci SAA. Koncentrace neznámých vzorků je vypočtena z kalibrační závislosti. Kalibrace je měřena vždy pro každou sadu vzorků. Koncentrace SAA je udávána v jednotkách ng/ml. Vzorky séra musí být před analýzou zředěny, používá se ředění 1 : 199.

10.10. Statistická analýza

Data jsou presentována jako průměr \pm S.D. pro parametrické veličiny, a medián (25-75% percentil) pro neparametrické veličiny. Normalita rozložení dat byla testována Shapiro-Wilks W testem. Rozdíly mezi 2 sledovanými skupinami byly testovány u parametrických veličin t -testem a u neparametrických veličin s pomocí Mann-Whitney U testu. Rozdíly mezi 3 a více skupinami byly srovnávány jednofaktorovou ANOVou s využitím Scheffého a Newman-Keulsova post-testu u parametrických veličin. U neparametrických veličin byla použita Kruskal-Wallisova ANOVA. Při korelační analýze byly korelace vyjádřeny pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Všechny

statistické analýzy byly provedeny ve statistickém programu Statistica, verze 9.0 až 12.0. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Clusterová analýza byla prováděna ve dvou krocích. V prvním kroku byl zredukován počet jednotlivých (vybraných) mastných kyselin a ve druhém kroku bylo provedeno rozřazení testovaných subjektů do jednotlivých clusterů. Pro redukci počtu vybraných mastných kyselin byla provedena kroková dopředná lineární diskriminační analýza s využitím Wilk's lambda kritéria. Vybráno bylo šest mastných kyselin, které byly poté použity pro clusterovou analýzu. Clusterová analýza byla provedena Wardovou metodou. Statistická analýza byla prováděna s využitím R software verze 3.1.0 (The R Development Core Team, 2014).

11. Výsledky

11.1. Metabolický syndrom

U pacientů s MetS byly pozorovány zvýšené koncentrace TC, TAG, apoB, NEFA a snížené koncentrace HDL-C a ApoA-I v porovnání s KON. V koncentracích LDL-C nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi MetS a KON. Základní klinické a biochemické charakteristiky souboru pacientů s MetS a KON pozorované ve studii Žák et al. (2014), jsou ukázány v tabulce 7.

Tabulka 7: Klinická a laboratorní charakteristika osob s metabolickým syndromem a kontrol

Proměnná	MetS	KON
N (M/Ž)	98/68	101/87
Věk (roky)	55,2 ± 10,6	54,5 ± 11,9
Váha (kg)	88,4 ± 15,6 ***	77,4 ± 14,4
BMI (kg.m-2)	29,8 ± 4,0 ***	26,5 ± 4,1
Obvod pasu (cm)	103 ± 10 ***	91 ± 12
STK (mm Hg)	141 ± 17 ***	129 ± 14
DTK (mm Hg)	88 ± 10 ***	80 ± 9
T (%) (D.-W.)	33,9 ± 6,9 ***	30,0 ± 7,6
T (kg)	29,8 ± 7,6 ***	23,3 ± 7,9
Glukóza (mmol/l)	5,96 ± 1,92 ***	4,99 ± 1,27
Inzulín (mU/l)	12,42 ± 7,43 ***	8,66 ± 5,39
HOMA-IR	3,40 ± 2,64 ***	1,97 ± 1,68
TC (mmol/l)	6,42 ± 1,43 *	6,05 ± 1,26
TAG (mmol/l)	3,69 ± 1,79 ***	1,79 ± 2,14
HDL-C (mmol/l)	1,27 ± 0,35 ***	1,53 ± 0,37
NEFA (mmol/l)	0,81 ± 0,61 ***	0,60 ± 0,37
Apo B (g/l)	1,36 ± 0,34 ***	1,21 ± 0,37
KD v LDL (μmol/l)	70,1 ± 21,5 ***	59,7 ± 20,6

Zkratky: N – počet; M – muži; Ž – ženy; STK, DTK – systolický (resp. diastolický) TK; BMI – body mass index; T – tělesný tuk, D.-W. – Durnin-Womersley; HOMA-IR – homeostasis model assessment for insulin resistance; TC – celkový cholesterol; TAG – triacylglyceroly; HDL-C – cholesterol v lipoproteinu o vysoké hustotě; NEFA – neesterifikované mastné kyseliny; Apo – apolipoprotein; KD- konjugované dieny; LDL – lipoprotein o nízké hustotě.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. Studentův t – test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; (Žák A. et al., 2014).

Významné změny byly pozorovány v profilu FA, jak je ukázáno v tabulce 8. Pacienti s MetS v porovnání s KON měli signifikantně zvýšené množství SFA, což bylo dáno nárůstem hladiny kyseliny stearové. Nebyl pozorován žádný rozdíl v podílu souhrnu všech MUFA mezi MetS a KON, i když pacienti s MetS měli vyšší podíl kyseliny palmitolejové než KON. Naopak hladiny PUFA n-6 byly u pacientů s MetS sníženy oproti KON. Snížení PUFA n-6 bylo způsobeno výrazným poklesem množství kyseliny linolové. U hodnot PUFA n-3 nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi pacienty a KON. Pacienti s MetS měli ve srovnání s KON zvýšené aktivity $\Delta 9$ desaturasy kyselin palmitové a $\Delta 6$ desaturasy, naopak měli sníženou aktivitu $\Delta 5$ desaturasy.

Na základě složení FA v plazmatických PL u jedinců s MetS a zdravých kontrol jsme clusterovou analýzou FA rozdělili sledované skupiny do dvou shluků. Probandi s MetS v clusteru 1 se od jedinců s MetS v clusteru 2 lišili koncentracemi glukózy, NEFA, HOMA-IR a hladin konjugovaných dienu v precipitovaných částicích LDL. Složení FA pacientů v clusteru 1 se od pacientů v clusteru 2 lišilo vyšším obsahem kyselin palmitoleové (+30%), γ -linolenové (+22%), dihomo- γ -linolenové (+9%) a nižším obsahem kyseliny linolové (-25%). Předpokládá se, že tyto FA vzory souvisejí s progresí a / nebo zhoršenými biochemickými měřítky MetS, jako je například lipolýza, oxidační stres, dysglykémie a inzulinová rezistence. Tabulka 9 ukazuje klinické a biochemické charakteristiky clusterů MetS a tabulka 10 složení FA v clusteru 1 a clusteru 2 MetS.

Asociaci mezi individuálními koncentracemi FA v plazmatickém fosfatidylcholinu a základními antropometrickými, klinickými a biochemickými ukazateli jsme analyzovali u 300 osob s metabolicky nezdravou obezitou a 70 jedinci kontrolní skupiny. Krokovou regresní analýzou jsme prokázali, že složení FA v plazmatickém PC determinuje významně parametry adipozity a distribuce tukové tkáně (Tabulka 11).

Tabulka 8: Složení mastných kyselin osob s metabolickým syndromem a kontrol

Proměnná	MetS	KON
N (M/Ž)	98/68	101/87
14:0	0,28 ± 0,08	0,28 ± 0,09
16:0	29,68 ± 1,73	29,4 ± 1,60
16:1n-9	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,03
16:1n-7	0,63 ± 0,24 **	0,57 ± 0,22
18:0	14,44 ± 1,28 ***	13,84 ± 1,14
18:1n-9	10,06 ± 1,62	10,03 ± 1,73
18:1n-7	1,56 ± 0,36	1,61 ± 0,37
18:2n-6	21,94 ± 3,16 ***	23,54 ± 3,00
18:3n-6	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,04
18:3n-3	0,21 ± 0,08	0,22 ± 0,08
20:1n-9	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,04
20:2n-6	0,41 ± 0,12	0,40 ± 0,11
20:3n-6	3,35 ± 0,70 ***	2,98 ± 0,56
20:4n-6	10,99 ± 2,05	10,91 ± 1,83
20:5n-3	1,12 ± 0,72	1,05 ± 0,64
22:4n-6	0,31 ± 0,08	0,32 ± 0,07
22:5n-6	0,20 ± 0,06	0,20 ± 0,05
22:5n-3	0,90 ± 0,18	0,91 ± 0,17
22:6n-3	3,56 ± 1,11	3,36 ± 0,95
ΣSFA	44,47 ± 1,68 ***	43,59 ± 1,43
ΣMUFA	12,48 ± 2,04	12,45 ± 2,12
ΣPUFA n-6	37,22 ± 3,20 **	38,38 ± 2,77
ΣPUFA n-3	5,79 ± 1,77	5,55 ± 1,53
Δ9D (16:1n-7/16:0)	0,021 ± 0,008 **	0,019 ± 0,008
Δ9D (18:1n-9/18:0)	0,700 ± 0,120	0,730 ± 0,150

Zkratky a vysvětlivky: N – počet; SFA – nasycené mastné kyseliny; MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny; Σ - suma (celkové); PUFA n-3 (resp. – n-6) – vícenenasyčené mastné kyseliny řady n-3 (resp. n-6); označení mastné kyseliny: počet C atomů: počet dvojných vazeb; n – počet atomů C od metylového konce kyseliny k první dvojně vazbě; D – desaturasa.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (v mol %). Studentův t – test: ** p < 0,01, *** p < 0,001; (Žák A. et al., 2014).

Tabulka 9: Klinické a biochemické charakteristiky clusterů metabolického syndromu

Proměnná	Cluster 1	Cluster 2
N (M/Ž)	67/42	31/26
Věk (roky)	54,6 ± 11,1	56,3 ± 9,5
Váha (kg)	89,9 ± 15,7	85,5 ± 15,0
BMI (kg.m ⁻²)	30,2 ± 4,1	29,1 ± 3,8
Obvod pasu (cm)	104 ± 11 ^{a*}	101 ± 9
STK (mm Hg)	141 ± 15	142 ± 15
DTK (mm Hg)	88 ± 9	89 ± 10
T (%) (D.-W.)	33,3 ± 6,8	35,3 ± 6,9
T (kg)	29,7 ± 7,7	29,9 ± 7,4
Fenotyp MetS _{gly}	6 (5,5) ^{b, c*}	7 (12,3)
Fenotyp MetS _{glylip}	50 (45,9)	16 (28,1)
Fenotyp MetS _{lip}	53 (48,6)	34 (59,6)
Glukóza (mmol/l)	6,24 ± 2,22 ^{**}	5,44 ± 0,96
Inzulín (mU/l)	12,88 ± 7,22	11,61 ± 7,79
HOMA-IR	3,65 ± 2,57 [*]	2,97 ± 2,74
TC (mmol/l)	6,51 ± 1,53	6,26 ± 1,21
TAG (mmol/l)	3,93 ± 3,11	3,22 ± 2,81
HDL-C (mmol/l)	1,25 ± 0,34	1,30 ± 0,36
NEFA (mmol/l)	0,92 ± 0,65 ^{***}	0,60 ± 0,48
ApoB (g/l)	1,36 ± 0,38	1,36 ± 0,26
KD v LDL (μmol/l)	74,6 ± 23,5 [*]	63,5 ± 16,3

Zkratky a vysvětlivky: N – počet; M – muži; Ž – ženy; STK, DTK – systolický (resp. diastolický) TK; BMI – body mass index; T – tělesný tuk; D.-W. – Durnin-Womersley; MetS – metabolický syndrom; HOMA-IR – homeostasis model assessment for insulin resistance; TC – celkový cholesterol; TAG – triacylglyceroly; HDL-C – cholesterol v lipoproteinu o vysoké hustotě; NEFA – neesterifikované mastné kyseliny; Apo – apolipoprotein; KD – konjugované dieny; LDL – lipoprotein o nízké hustotě. Charakterizace fenotypu MetS podle přítomných komponent: MetS_{gly} – zvětšený obvod pasu, hypertenze, zvýšená glykémie; MetS_{glylip} – zvětšený obvod pasu, hypertenze, zvýšená glykémie, zvýšená koncentrace TAG a/nebo snížená koncentrace HDL-C; MetS_{lip} – zvětšený obvod pasu, hypertenze, zvýšená koncentrace TAG a/nebo snížená koncentrace HDL-C;

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. ^a – Studentův t-test; ^b – počet (%); ^c – Fisherův exaktní test. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. (Žák A. et al., 2014).

Tabulka 10: Složení mastných kyselin u clusterů metabolického syndromu

Proměnná	Cluster 1	Cluster 2
N (M/Ž)	67/42	31/26
14:0	0,28 ± 0,08	0,28 ± 0,08
16:0	29,89 ± 1,87 **	29,29 ± 1,34
16:1n-9	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,02
16:1n-7	0,69 ± 0,24 ***	0,53 ± 0,19
18:0	14,59 ± 1,34 *	14,16 ± 1,12
18:1n-9	10,50 ± 1,56	9,20 ± 1,38
18:1n-7	1,62 ± 0,38 ***	1,45 ± 0,30
18:2n-6	20,17 ± 2,07 ***	25,31 ± 1,88
18:3n-6	0,10 ± 0,05 *	0,08 ± 0,03
18:3n-3	0,21 ± 0,07	0,21 ± 0,09
20:1n-9	0,14 ± 0,05	0,13 ± 0,03
20:2n-6	0,42 ± 0,13	0,40 ± 0,10
20:3n-6	3,45 ± 0,70 *	3,16 ± 0,68
20:4n-6	11,34 ± 2,03 **	10,34 ± 1,95
20:5n-3	1,27 ± 0,82 ***	0,84 ± 0,32
22:4n-6	0,32 ± 0,08	0,29 ± 0,06
22:5n-6	0,21 ± 0,06	0,18 ± 0,05
22:5n-3	0,94 ± 0,19 ***	0,82 ± 0,13
22:6n-3	3,76 ± 1,18 **	3,20 ± 0,85
ΣSFA	44,85 ± 1,84 ***	43,79 ± 1,04
ΣMUFA	13,08 ± 1,96 ***	11,40 ± 1,74
ΣPUFA n-6	35,84 ± 2,79 ***	39,70 ± 2,28
ΣPUFA n-3	6,19 ± 1,95 ***	5,07 ± 1,06
Δ9D (16:1n-7/16:0)	0,023 ± 0,008 ***	0,018 ± 0,007
Δ9D (18:1n-9/18:0)	0,726 ± 0,120 **	0,655 ± 0,118

Zkratky a vysvětlivky: N – počet; SFA – nasycené mastné kyseliny; MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny; Σ - suma (celkové); PUFA n-3 (resp. – n-6) – vícenenasyčené mastné kyseliny řady n-3 (resp. n-6); označení mastné kyseliny: počet C atomů: počet dvojných vazeb, n – počet atomů C od metylového konce kyseliny k první dvojně vazbě; D – desaturasa.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (v mol %). Studentův t – test: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001; (Žák A. et al., 2014).

Tabulka 11: Vícerozměrný lineární regresní model pacientů s vysokým kardiometabolickým rizikem

	F	Regresní koeficient β	S.D.	t	Příspěvek (%)	P
Závislá proměnná: Pas ; F=17.094; Adj. $R^2=0,27$						
Intercept		+109,807	12,037	9,122		0,000000
Pohlaví/muži	37,91	+7,158	1,293	5,536	10,99	0,000000
20:3n-6	17,94	+2,899	0,900	3,221	4,66	0,001422
22:5n-3	0,23	-12,211	2,610	-4,679	2,47	0,000004
18:2n-6	19,65	-0,949	0,267	-3,551	3,41	0,000448
18:1n-9	4,42	-2,236	0,477	-4,684	3,16	0,000004
18:0	12,79	+1,618	0,474	3,412	1,52	0,000736
16:1n-7	1,24	+9,467	3,953	2,395	1,17	0,017270
Závislá proměnná: WHR ; F=43,26784; Adj. $R^2=0,41$						
Intercept		+0,424	0,075	5,669		0,000000
Pohlaví/muži	158,38	+0,099	0,008	13,040	34,48	0,000000
18:0	9,99	+0,013	0,003	4,678	1,73	0,000004
16:0	2,29	+0,006	0,001	4,605	2,64	0,000006
Věk	1,99	+0,001	0,000	3,059	1,54	0,002423
20:3n-6	2,80	+0,012	0,005	2,477	1,02	0,013809
Závislá proměnná: T (%) ; F=50,24893; Adj. $R^2=0,62$						
Intercept		+5,641	8,258	0,683		0,495127
Pohlaví/muži	243,90	-10,103	0,668	-15,119	44,82	0,000000
22:5n-3	65,21	-8,697	1,581	-5,499	10,30	0,000000
Věk	38,14	+0,172	0,036	4,789	2,13	0,000003
20:3n-6	0,13	+2,104	0,447	4,703	1,67	0,000004
20:1n-9	9,63	-16,525	7,752	-2,132	0,73	0,03387
20:5n-3	14,20	+1,404	0,620	2,265	0,60	0,024261
18:0	0,30	+0,755	0,248	3,044	0,28	0,002551
16:0	11,30	+0,505	0,145	3,475	0,71	0,000590
16:1n-7	1,94	-3,677	1,471	-2,499	0,36	0,012994
18:3n-3	4,85	+8,792	3,646	2,412	0,63	0,016499
Závislá proměnná: T (kg) ; F=16,27317; Adj. $R^2=0,29$						
Intercept		-8,459	11,812	-0,716		0,474463
22:5n-3	49,22	-12,771	2,414	-5,291	13,89	0,000000
20:3n-6	3,49	+3,771	0,698	5,402	5,96	0,000000
Pohlaví/muži	20,29	-5,016	1,005	-4,992	3,57	0,000001
20:5n-3	3,51	+2,323	0,981	2,369	1,38	0,018502
18:0	3,57	+1,373	3,412	3,412	1,70	0,000736
16:0	11,89	+0,742	0,202	3,679	0,79	0,000279
18:1n-9	1,71	-0,913	0,309	-2,950	1,12	0,003439
18:3n-3	1,51	+11,424	6,152	1,857	0,60	0,064333

Zkratky a vysvětlivky: T – tělesný tuk; WHR – poměr pas/boky (waist/hip ratio). Označení mastné kyseliny: počet C atomů: počet dvojných vazeb, n – počet atomů C od metylového konce kyseliny k první dvojně vazbě. R^2 – poměr rozptylu (adjustovaný na počet proměnných); (Zeman M. et al, 2017).

Pacienti s MetS měli signifikantně zvýšené koncentrace KD a sníženou arylerosterasovou aktivitu PON1 oproti KON. Pokud byla arylerosterasová aktivita PON1 sledována v závislosti na počtu komponent metabolického syndromu (0-5 komponent) bylo zjištěno, že u osob, které splňovaly všech 5 faktorů pro diagnostiku MetS byla aktivita PON1 signifikantně nižší než u osob s 0-3 faktory MetS. Bylo-li stejné srovnání provedeno pro hodnoty KD v precipitovaných LDL částicích bylo zjištěno výrazné navýšení hladin KD/LDL jak u osob se 4 tak s 5 faktory MetS oproti osobám s 0 až 3 faktory MetS.

Dále bylo sledováno, jak se u pacientů s MetS mění aktivita PON1-A v závislosti na hodnotách apoA-I a HDL-C. Výsledky ukazují, že nejnižší aktivita PON1-A byla u pacientů se sníženými koncentracemi jak apoA-I, tak HDL-C, ale i pacienti se sníženými koncentracemi buďto jen HDL-C nebo jen apoA-I měli aktivitu PON1-A nižší než pacienti s hodnotami apoA-I a HDL-C v referenčním rozpětí.

Získané výsledky ukazují, že pouze obezita nebo pouze hypertenze nezpůsobuje rozdíly v hodnotách KD/LDL ani PON1-A.

11.2. Karcinom pankreatu

U pacientů s KP byl studován jednak profil FA v základních lipidových třídách – ve fosfolipidech, v cholesterollesterech i v triacylglycerolech (Macásek J. et al., 2012), dále byla sledována úroveň oxidačního stresu a aktivita antioxidantního enzymu PON1 (Kodydková J. et al., 2013).

Pacienti s KP měli signifikantně snížené koncentrace TC (Kodydková J. et al., 2013), HDL-C, apoA-I a LDL-C (Kodydková J. et al., 2013), naopak koncentrace TAG a NEFA byly u KP zvýšené oproti KON.

V profilu FA byly největší rozdíly mezi KP a KON pozorovány ve třídě PL a nejmenší ve třídě TAG. Zaměříme-li se na profil FA ve PL, nalezneme zvýšení podílu SFA u KP oproti KON dané nárůstem hladiny kyseliny palmitové, naopak hladina kyseliny stearové poklesla. Dále bylo pozorováno zvýšení podílu MUFA u KP oproti KON, na kterém se podílely kyseliny palmitolejová, olejová a elaidové. Nárůst SFA a MUFA u KP proběhl na úkor PUFA, pacienti s KP měli nižší podíl jak PUFA n-3 tak n-6 než KON. Z n-6 PUFA byla snížena hlavně hladina kyseliny linolové, dále byly nižší i hladiny kyselin γ -linolenové a dihomogamma-linolenové; z n-3 PUFA byly sníženy hladiny kyselin α -linolenové a EPA. Ve složení FA v plazmatických PL byl pozorován negativní trend mezi stádiem KP a koncentracemi ALA, DHGLA, EPA a celkovým zastoupením PUFA n-3.

Na rozdíl od profilu FA ve fosfolipidech, v profilu FA v CE a TAG nebyl pozorován nárůst podílu sumy SFA ani jednotlivých SFA. V cholesterolsterech byl zjištěn zvýšený podíl MUFA u KP oproti KON, na kterém se podílely kyseliny palmitoolejová, olejová a elaidové stejně jako ve fosfolipidech, v TAG byl nárůst MUFA podmíněn pouze zvýšením podílu kyseliny olejové. V VE byl zjištěn snížený podíl PUFA n-6, ale hladiny PUFA n-3 nebyly rozdílné mezi KP a KON. V TAG naopak nebyl rozdíl mezi KP a KON v hladinách PUFA n-6 a snížené byly pouze hladiny PUFA n-3. V CE byly sníženy podíly kyselin linolové, arachidonové, α -linolenové a DHA. V TAG byly sníženy hladiny kyselin γ -linolenové, α -linolenové a EPA.

U pacientů s KP byly zvýšené aktivity obou $\Delta 9$ desaturas (kyseliny pamitové i stearové) jak v PL, tak v CE a $\Delta 5$ desaturasy ve všech třídách FA.

Pacienti s KP měli zvýšené hladiny jak KD v precipitovaných LDL částicích, tak ox-LDL a SAA. U pacientů s KP byla pozorována závislost koncentrace KD na stádiu onemocnění – s pokročilostí nemoci se zvyšovala koncentrace KD. Dále byla pozorována snížená aktivita PON1 a to jak arylesterasová, tak laktonasová aktivita PON1.

Mezi KP pacienty s a bez DM nebyl pozorován rozdíl v aktivitách PON1. Na rozdíl od DM, malnutrice u KP pacientů měla vliv na hodnoty PON1 i KD/LDL, ox-LDL a SAA. Pacienti s malnutricí měli signifikantně vyšší hladiny ox-LDL a SAA a nižší aktivity PON1-A a PON1-L než KP pacienti bez malnutrice, obě skupiny KP pacientů měli hodnoty ox-LDL a SAA vyšší a aktivity PON1-A a PON1-L nižší než zdravé KON. Hladiny KD v precipitovaných LDL částicích byly zvýšené oproti KON jen ve skupině s malnutricí, která měla vyšší hladiny KD/LDL než KP pacienti bez malnutrice.

11.3. Chronická pankreatitida

Pacientům s ChP byly věnovány dvě studie, první byla zaměřena na profil FA v sérových fosfolipidech (Zeman M. et al., 2016) a druhá na antioxidační systém organismu a markery oxidačního stresu (Kodydková J. et al., 2013). V obou studiích byly sledovány i základní lipidové parametry. U pacientů s ChP byly zjištěny snížené koncentrace TC (Zeman M. et al., 2016), HDL-C (Zeman M. et al., 2016) a LDL-C (Zeman M. et al., 2016; Kodydková J. et al., 2013) a zvýšené koncentrace TAG (Zeman M. et al., 2016; Kodydková J. et al., 2013) a NEFA (Kodydková J. et al., 2013) oproti KON.

Rozdíly v profilu FA při srovnání pacientů s ChP a KON byly velmi výrazné. Všechny sledované MUFA byly zvýšené u pacientů s ChP oproti KON a tedy i suma všech MUFA byla u ChP vyšší než u KON. Naopak sumy PUFA n-6 a n-3 byly u pacientů s ChP sníženy oproti KON. Snížení sumy PUFA n-6 bylo podmíněno snížením hladin kyseliny linolové, což bylo doplněno naopak zvýšením téměř všech ostatních sledovaných PUFA n-6 s výjimkou kyseliny arachidonové, jejíž hladiny byly u ChP i KON srovnatelné. Snížené hladiny sumy PUFA n-3 byly dány snížením kyseliny DHA. V hladinách jednotlivých SFA i v sumě SFA nebyl pozorován žádný rozdíl mezi ChP a KON. Pacienti s ChP měli zvýšenou aktivitu obou $\Delta 9$ desaturas (jak desaturasa kyseliny palmitové tak stearové), a i $\Delta 5$ a $\Delta 6$ desaturasy v porovnání s KON. Nebyl zjištěn rozdíl v profilu FA mezi ChP pacienty s DM a bez DM, v malnutrici a bez malnutrice či mezi muži a ženami. U pacientů s ChP byla provedena diskriminační analýza, jejímž cílem bylo najít FA, které jednoznačně odlišují pacienty s ChP od KON. Tabulka 12 ukazuje diskriminační model pro odlišení ChP a zdravých kontrol na základě složení FA.

Tabulka 12: Diskriminační model chronické pankreatitidy a zdravých kontrol

	F-statistika (d.f.)	Koeficient	Výsledná správná klasifikace (%)
18:2n-6	105,42 (1,193)	1,045	Chronická pankreatitida: 89,3
20:3n-6	72,16 (2,192)	-0,563	Kontroly: 91,2
22:6n-3	66,63 (3,191)	0,831	Celkem: 90,3
20:1n-9	57,92 (4,190)	-0,350	
16:0	49,08 (5,189)	0,326	
18:1n-7	42,15 (6,188)	-0,311	
16:1n-9	37,06 (7,187)	0,200	
22:5n-3	32,83 (8,186)	-0,189	

Vysvětlivky: d.f. - stupeň volnosti; F statistika (tzv. aproximovaná F statistika) - transformace Wilksova γ . Označení mastné kyseliny: počet C atomů: počet dvojných vazeb, n – počet atomů C od metylového konce kyseliny k první dvojně vazbě; (Zeman M. et al., 2016).

U pacientů s ChP byly prokázány signifikantně zvýšené hladiny KD v precipitovaných LDL a ox-LDL částic než u KON. Aktivity PON1 jak arylerasová tak laktonasová byly u ChP sníženy oproti KON. Nárůst koncentrace SAA u ChP nedosáhl signifikantního významu, lze hovořit pouze o trendu zvýšených koncentrací SAA u ChP v porovnání s KON.

Ve studii Kodydková et al. (2013) byla provedena diskriminační analýza, jejímž cílem bylo nalézt parametry oxidační rovnováhy, které by dokázaly spolehlivě odlišit pacienty s KP a ChP. Celkem byly vypracovány 3 diskriminační modely k odlišení chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu, které jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Diskriminační modely chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu

Model A	F-statistika (d.f.)	Výsledná správná klasifikace (%)	
ox-LDL	13,80 (1,98)	ChP	74,0
ox-LDL+KD/LDL	11,32 (2,97)	KP	72,0
		Celkem	73,0
Model B	F-statistika (d.f.)	Výsledná správná klasifikace (%)	
PON1-L	31,77 (1,98)	ChP	68,0
PON1-L+SOD1	19,33 (2,97)	KP	74,0
PON1-L+SOD1+KAT	14,83 (3,96)	Celkem	71,0
Model C	F - statistika (d.f.)	Výsledná správná klasifikace (%)	
PON1-L	31,77 (1,98)	ChP	80,0
PON1-L+ox-LDL	27,72 (2,97)	KP	86,0
PON1-L+ox-LDL + KAT	21,32 (3,96)	Celkem	83,0

Zkratky a vysvětlivky: d.f. - stupeň volnosti; F statistika (tzv. aproximovaná F statistika) - transformace Wilksova γ ; KD/LDL - konjugované dieny v precipitovaných LDL; ox-LDL - oxidované LDL; SAA - serový amyloid A; PON1-A - paraoxonasa 1- arylesterasová aktivita; PON1-L - paraoxonasa-lactonasová aktivita; GPX1 - glutathionperoxidasa 1; GR - glutathionreduktasa; SOD1- superoxididismutasa 1; KAT - katalasa; ChP - chronická pankreatitida, KP - karcinom pankreatu.

Model A - do analýzy zahrnuty pouze markery oxidačního stresu (KD/LDL, ox-LDL/LDL, SAA). Model B - do analýzy zahrnuty pouze aktivity antioxidantních enzymů (SOD1, CAT, GPX1, GR, PON1-A, PON1-L). Model C - kombinace modelů A a B; (Kodydková J. et al., 2013).

11.4. Konečné stádium onemocnění ledvin

Ve studii byl sledován profil lipoproteinových subfrakcí u pacientů v poslední fázi renálního selhání ve srovnání se zdravými kontrolami. Dále byly sledovány rozdíly v profilu lipoproteinových subfrakcí, ke kterým u pacientů s ESRD došlo za pět let na dialýze. Vzhledem k tomu, že pětileté období na dialýze přežilo pouze 14 pacientů, byly srovnávány též počáteční hodnoty přeživších a nepřeživších pacientů s ESRD.

U pacientů s ESRD byly pozorovány snížené koncentrace TC, HDL-C, LDL-C a zvýšené koncentrace TAG v porovnání s KON.

Zatímco zdravé osoby měly rovnoměrné zastoupení cholesterolu ve VLDL, IDL a velkých LDL částicích a jen malý podíl cholesterolu byl situován do malých LDL částic, pacienti s ESRD měli největší podíl cholesterolu ve VLDL částicích, kde ho měli signifikantně více než KON. Dále pacienti s ESRD měli velký podíl cholesterolu situovaný do IDL částic, i zde měli větší zastoupení cholesterolu než KON. Naopak mnohem menší podíl cholesterolu byl u pacientů s ESRD ve velkých LDL částicích. Množství cholesterolu v malých LDL bylo u obou skupin srovnatelné.

Distribuce cholesterolu v rámci subfrakcí HDL částic byla též rozdílná u pacientů s ESRD a KON. Zdravé kontroly měly největší podíl cholesterolu ve středně velkých HDL a nejmenší podíl cholesterolu pak ve velkých HDL částicích. Pacienti s ESRD měli největší zastoupení cholesterolu ve velkých HDL a nejmenší v malých HDL. Zastoupení cholesterolu se tak mezi ESRD a KON signifikantně lišilo ve všech subfrakcích HDL.

V základních lipidových parametrech nebyl pozorován rozdíl mezi přeživšími a nepřeživšími pacienty s ESRD, jedinou výjimkou byly koncentrace HDL-C, které byly u nepřeživších nižší než u přeživších. Rozdíly mezi přeživšími a nepřeživšími nebyl zjištěn ani v zastoupení cholesterolu v jednotlivých LDL či HDL subfrakcích.

Při porovnání dat z počátku studie a po pěti letech (tabulka 14) byl v základních lipidových parametrech pozorován pouze signifikantní pokles v koncentracích LDL-C v odběru po pěti letech. Na druhou stranu v profilech lipidových subfrakcí došlo k výrazným změnám. Po pěti letech došlo ke snížení podílu cholesterolu ve VLDL a naopak k nárůstu zastoupení cholesterolu v IDL, velkých a malých LDL. I v distribuci cholesterolu v rámci HDL subfrakcí došlo k značným změnám. Po pěti letech dialýzy byl zaznamenán pokles podílu cholesterolu ve velkých HDL a nárůst podílu cholesterolu ve středně velkých a malých HDL částicích.

Tabulka 14: Základní charakteristiky přeživších na začátku a po 5 letech

Parametr	Počátek HV-HDF (n= 13)	Konec sledování (n = 13)
BMI (kg.m ⁻²)	28,1 ± 7,1	27,6 ± 8,3
systolický krevní tlak (mmHg)	143,8 ± 19,6	136,2 ± 22,1
diastolický krevní tlak (mmHg)	74,0 ± 9,6	65,6 ± 16,4
celkové Ca (mmol/l)	2,41 ± 0,29	2,22 ± 0,24
P anorganický (mmol/l)	1,98 ± 0,46	1,56 ± 0,55*
Mg (mmol/l)	1,08 ± 0,21	0,86 ± 0,24***
močovina (mmol/l)	16,8 ± 4,1	16,6 ± 4,7
kreatinin (μmol/l)	749 ± 146	822 ± 181
kyselina močová (μmol/l)	309 ± 50	260 ± 107
celkový protein (g/l)	67,2 ± 6,1	62,2 ± 4,8*
albumin (g/l)	38,2 ± 2,9	38,0 ± 4,2
CRP (mg/l)	3,3 (1,7-4,0)	9,1 (6,0-13,9)*
TC (mmol/l)	4,82 ± 0,98	4,24 ± 0,74
TAG (mmol/l)	2,24 ± 1,49	1,92 ± 1,07
HDL-C (mmol/l)	1,32 ± 0,45	1,32 ± 0,44
LDL-C (mmol/l)	2,54 ± 0,65	2,06 ± 0,67*
glukóza (mmol/l)	5,0 (4,6-6,2)	5,4 (4,7-6,1)
AIP (poměr)	0,18 ± 0,35	0,13 ± 0,35
eGFR (ml/s)	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,03
doba dialýzy (hod/týden)	14,37 ± 1,00	13,74 ± 0,73
OCM (poměr)	1,62 ± 0,31	1,83 ± 0,31*
β ₂ -mikroglobulin (mg/l)	16,4 ± 2,4	21,2 ± 2,5****
VLDL (% cholesterolu)	33,9 ± 6,5 ^a	18,4 ± 7,2**
celkem LDL (% cholesterolu)	42,8 ± 7,1	61,7 ± 10,7**
- IDL (IDL _{A-C}) ^d (% cholesterolu)	32,7 ± 6,8	37,3 ± 11,5
- velké LDL (LDL ₁₋₂) (% cholesterolu)	6,9 ± 3,9	16,2 ± 7,3**
- malé LDL (LDL ₃₋₇) (% cholesterolu)	0,0 (0,0 – 2,7)	4,1 (0,0 - 17)*
frakce HDL celkem (% cholesterolu)	24,1 ± 5,2	20,7 ± 5,8*
- velké HDL (HDL ₁₋₃) (% HDL-C)	46,5 ± 8,8	29,7 ± 8,6****
- střední HDL (HDL ₄₋₇) (% HDL-C)	36,4 ± 6,5	44,9 ± 4,5**
- malé HDL (HDL ₈₋₁₀) (% HDL-C)	17,2 ± 4,0	25,4 ± 11,2*

Zkratky: AIP - aterogenní index plazmy (= $\log(\text{TAG}(\text{mmol/l})/\text{HDL-C}(\text{mmol/l}))$); eGFR – odhadovaná rychlost glomerulární filtrace (ml/s); HV-HDF – vysokoobjemová hemodiafiltrace; OCM - on-line měření clearance; TAG – triacylglyceroly; TC – celkový cholesterol; CRP – C-reaktivní protein; VLDL - lipoproteiny o velmi nízké hustotě; IDL – lipoproteiny o střední hustotě; LDL - lipoproteiny o nízké hustotě; HDL - lipoproteiny o vysoké hustotě; HDL-C – cholesterol v HDL.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD pro parametrické veličiny a jako medián (0,25 -0,75 percentil) pro neparametrické veličiny. Studentův t – test: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; (Dušejovská M. et al., 2018).

11.5. Pacienti s rozdílnými hladinami ApoB-48

Sledované osoby byly rozděleny do dvou skupin na základě hodnot koncentrace apoB-48, první skupina byla tvořena osobami s koncentrací apoB-48 pod 7,9 mg/l, druhá osobami s koncentrací apoB-48 nad 7,9 mg/l. Jejich základní charakteristiky jsou prezentovány v tabulce 15. Mezi skupinami nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v BMI, množství tuku, koncentraci NEFA či počtu pacientů s nadváhou/obezitou. Pacienti s koncentrací apoB-48 nad 7,9 mg/l měli signifikantně zvýšené koncentrace TC, TAG, apoB, apoB-100 a sd-LDL cholesterolu a naopak snížené koncentrace HDL-C a apoA-I než osoby s koncentrací apoB-48 pod 7,9 mg/l.

Nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami v celkové hladině SFA, MUFA, n-6 ani n-3 PUFA. Skupina osob s koncentrací apoB48 nad 7,9 mg/l měla vyšší zastoupení kyseliny stearové, dihomo- γ -linolenové a dokosapentenové a nižší zastoupení kyseliny palmitové ve srovnání se skupinou s nízkou koncentrací apoB-48. Při srovnání obou skupin, pacienti s koncentrací apoB-48 nad 7,9 mg/l měli zvýšené aktivity $\Delta 9$ desaturasy jak pro kyselinu palmitovou, tak stearovou a také $\Delta 6$ desaturasy, naopak aktivita $\Delta 5$ desaturasy byla u těchto pacientů snížena. Tabulka 16 uvádí složení FA u jednotlivých skupin.

Pacienti s vyšší koncentrací apoB-48 měli signifikantně zvýšené hodnoty lipidových markerů oxidačního stresu – ox-LDL i KD.

Tabulka 15: Klinická a laboratorní charakteristika osob s různými koncentracemi apoB-48

Parametr	ApoB-48 < 7,9 (mg/l)	ApoB-48 ≥ 7,9 (mg/l)
Počet	108	112
Muži počet (%)	44 (40,7)	60 (53,6)
Věk (roky)	49,9 ± 14,7	52,9 ± 14,1
Probandi s MSC ≥3 počet (%)	35 (32,4)	67 (59,8)***
Fenotyp B velikosti LDL počet (%)	22(20,4)	52 (46,4)***
BMI (kg/m ²)	28,6 ± 5,7	29,4 ± 5,8
Obvod pasu (cm)	94,6 ± 15,2	98,9 ± 14,8*
STK (mm Hg)	131 ± 15	135 ± 18*
DTK (mm Hg)	87 ± 10	86 ± 11
Hmotnost tuku (kg)	32,5 ± 10,9	33,2 ± 10,8
TC (mmol/l)	5,08 ± 1,04	5,78 ± 1,35***
TAG (mmol/l)	0,99 (0,74 – 1,33)	1,95 (1,40 – 2,70)***
HDL-C (mmol/l)	1,59 ± 0,47	1,36 ± 0,36***
LDL-C (mmol/l)	2,98 ± 0,88	3,43 ± 1,08***
non-HDL-C (mmol/l)	3,49 ± 0,96	4,42 ± 1,22***
ApoA1 (g/l)	1,52 ± 0,33	1,40 ± 0,28**
ApoB-100 (g/l)	1,06 ± 0,31	1,28 ± 0,34***
ApoB-48 (mg/l)	4,4 (2, 9 – 6,1)	18,3 (10,6 – 29,2)***
NEFA (mmol/l)	0,54(0,35 – 0,71)	0,53 (0,39 – 0,71)
sd-LDL-C (mg/dl)	2,0 (0,0 – 5,0)	5,0 (2,0 – 17,0)***
Glukóza (mmol/l)	5,08 ± 0,64	5,20 ± 0,66
HOMA-IR (index)	1,654 (1,249 – 2,824)	2,554 (1,692 – 3,830)***
Inzulín (μU/ml)	7,48 (6,05 – 12,55)	10,55 (7,29 – 15,64)**
KD (μmol/l)	60,724 ± 15,437	67, 878 ± 16,849***
ox-LDL (U/l)	39,3 (18,7 – 58,6)	54,4 (29,2 – 71,3)**
hs-CRP (mg/l)	2,17 (1,03 – 4,20)	2,32 (1,13 – 4,10)
Kyselina močová (μmol/l)	297 ± 83	335 ± 91***

Zkratky: N – počet; M – muži; Ž – ženy; STK, DTK – systolický (resp. diastolický) TK; BMI – body mass index; T – tělesný tuk, D.-W. – Durnin-Womersley; HOMA-IR – homeostasis model assessment for insulin resistance; TC – celkový cholesterol; TAG – triacylglyceroly; HDL-C – cholesterol v lipoproteinu o vysoké hustotě; NEFA– neesterifikované mastné kyseliny; Apo – apolipoprotein; KD- konjugované dieny; LDL – lipoprotein o nízké hustotě.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD pro parametrické veličiny a jako medián (0,25 -0,75 percentil) pro neparametrické veličiny. Studentův t – test: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001; (Staňková B. et al., 2019).

Tabulka 16: Složení FA v PC u osob s různými koncentracemi apoB-48

Proměnná	ApoB-48 < 7,9 (mg/l)	ApoB-48 ≥ 7,9 (mg/l)
14:0	0,192 ± 0,107	0,226 ± 0,098*
14:1n-5	0,0089 (0,0055 – 0,0162)	0,0083 (0,0058 – 0,0172)
16:0	31,91 ± 4,73	30,72 ± 3,514*
16:1n-9	0,121 ± 0,033	0,122 ± 0,032
16:1n-7	0,569 ± 0,195	0,610 ± 0,202
18:0	14,13 ± 1,659	14,89 ± 1,453***
18:1n-9	10,99 ± 1,431	10,65 ± 1,998
18:1n-7	1,529 ± 0,195	1,510 ± 0,212
18:2n-6	23,60 ± 3,033	23,23 ± 3,560
18:3n-6	0,099 ± 0,033	0,111 ± 0,042*
18:3n-3	0,242 ± 0,094	0,227 ± 0,100
20:0	0,043 ± 0,019	0,043 ± 0,016
20:1n-9	0,123 ± 0,041	0,119 ± 0,035
20:2n-6	0,405 ± 0,128	0,434 ± 0,180
20:3n-6	2,755 ± 0,794	3,059 ± 0,752**
20:4n-6	9,583 ± 2,409	9,638 ± 2,340
20:5n-3	0,939 ± 0,576	0,840 ± 0,369
22:4n-6	0,200 ± 0,097	0,240 ± 0,111**
22:5n-6	0,137 ± 0,069	0,157 ± 0,079*
22:5n-3	0,495 (0,276 – 0,726)	0,668 (0,398 – 0,874)**
22:6n-3	1,708 (1,010 – 2,847)	2,147 (1,279 – 3,282)
ΣSFA	46,29 ± 3,805	45,92 ± 3,477
ΣMUFA	13,35 ± 1,548	13,00 ± 2,187
ΣPUFAn-6	36,65 ± 3,431	37,06 ± 3,561
ΣPUFAn-3	3,708 ± 1,790	4,025 ± 1,687
Δ9D (16:1n-7/16:0)	0,018 ± 0,005	0,020 ± 0,006**
Δ9D (18:1n-9/18:0)	0,787 ± 0,128	0,720 ± 0,143***

Zkratky a vysvětlivky: N – počet; SFA – nasycené mastné kyseliny; MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny; Σ - suma (celkové); PUFA n-3 (resp. – n-6) – vícenenasyčené mastné kyseliny řady n-3 (resp. n-6); označení mastné kyseliny: počet C atomů: počet dvojných vazeb, n – počet atomů C od metylového konce kyseliny k první dvojně vazbě; D – desaturasa.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD pro parametrické veličiny a jako medián (0,25 -0,75 percentil) pro neparametrické veličiny. Studentův t – test: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001; (Staňková B. et al., 2019).

12. Diskuse

Předkládaná disertační práce se věnuje problematice lipidového metabolismu u pacientů s různými druhy onemocnění, vždy ve srovnání se zdravou kontrolní skupinou, a u osob se zvýšeným kardiometabolickým rizikem. Do prováděných studií byli zařazeni pacienti s metabolickým syndromem, s karcinomem pankreatu, pacienti s chronickou pankreatitidou a pacienti v konečném stádiu onemocnění ledvin. Sledovány byly rozmanité parametry lipidového metabolismu – kromě základních lipidových markerů jako jsou TC, TAG, HDL-C, LDL-C, ApoA-I, či ApoB byla dále analyzována koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin, profil mastných kyselin v plazmatických fosfolipidech (v některých studiích i v TAG a CE), profil lipoproteinových (LDL a HDL) subfrakcí, koncentrace apoB-48, hladiny lipidových markerů oxidačního stresu – konkrétně konjugovaných dienu v precipitovaných LDL a oxidačně modifikovaných LDL a s lipidy asociovaného antioxidačního enzymu paraoxonasa 1.

12.1. Mastné kyseliny

12.1.1. Metabolický syndrom

U pacientů s MetS byly pozorovány zvýšené koncentrace NEFA v porovnání s KON. Jak ukazují výsledky klinických studií NEFA hrají podstatnou roli v patogenezi insulinové rezistence a v následném rozvoji metabolického syndromu (Suiter C. et al., 2018). Podle jedné finské studie zvýšené hladiny NEFA jsou indikátorem/prediktorem rozvoje hyperglykémie a DM 2. typu (Mahendran Y. et al., 2013). Navíc zvýšená koncentrace NEFA může přispět k subklinickému systémovému zánětu.

Pacienti s MetS v porovnání s KON měli signifikantně zvýšené množství SFA podmíněné nárůstem podílu kyseliny stearové a snížený podíl n-6 PUFA. Snížení PUFA n-6 bylo způsobeno výrazným poklesem množství kyseliny linolové. Pozorované výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky (Warensjö E. et al., 2005; Žák A. et al., 2007). V podílu souhrnu MUFA a PUFA n-3 nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi pacienty a KON. Podle mnohých autorů mají být snížené hladiny PUFA n-3 spojeny s rozvojem/progresí MetS (Lee E. et al., 2008; Mahendran Y. et al., 2013; Warensjö E. et al., 2006).

Stejně jako v dříve publikovaných studiích, byla u pacientů s MetS ve srovnání s KON pozorována zvýšená aktivita $\Delta 9$ desaturasy kyseliny palmitové a $\Delta 6$ desaturasy, naopak aktivita $\Delta 5$ desaturasy byla snížena. Dřívější studie ukázaly, že takovéto změny v profilu FA korelují jak se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem, tak s vyšším rizikem rozvoje DM 2. typu (Kröger J. et al., 2011; Warensjö E. et al., 2008).

V rámci jedné naší studie u pacientů s MetS byla provedena clusterová analýza profilu mastných kyselin v plazmatických fosfolipidech. Clusterová analýza má zkoumané subjekty rozdělit do skupin – clusterů na základě vzájemné podobnosti. Výsledky naší studie u pacientů s MetS ukazují, že na základě zastoupení šesti FA – dihomog- γ -linolenové, stearové, myristové, dokosahexenové, dokosapentenové a linolové je možné pacienty rozdělit do dvou clusterů. První cluster obsahoval pacienty s rizikovějším profilem – s vyššími hodnotami NEFA, KD/LDL, glukózy, HOMA-IR a zároveň s negativně změněným profilem FA. Ve studii Žák et al. (2007) bylo prokázáno, že hladiny kyselin palmitové, palmitolejové, stearové, dihomog- γ -linolenové a linolové stejně jako aktivity $\Delta 9$ a $\Delta 6$ desaturas korelují s počtem komponent MetS.

12.1.2. Pacienti se zvýšenou hladinou apoB-48

Při hodnocení spektra mastných kyselin plazmatického fosfatidylcholinu byla ve skupině s koncentrací apoB-48 $\geq 7,9$ mg/l prokázána vyšší aktivita delta-9 desaturázy pro kyselinu palmitovou ($\Delta 9D16$), vyšší aktivitu $\Delta 6D$ a nižší aktivitu $\Delta 5D$. Aktivita $\Delta 9D$ pro kyselinu stearovou ($\Delta 9D18$) byla ve skupině s vyšší koncentrací apoB-48 nižší. Poměr 16:1n-7/16:0 ($\Delta 9D16$) je surogátním markerem aktivity SCD-1, poměr 20:4n-6/20:3n-6 ($D5D$) je markerem aktivity FADS1 a poměr 18:3n-6/18:2n-6 ($\Delta 6D$) markerem aktivity FADS2.

Zvýšení aktivit $\Delta 9D$, $\Delta 6D$ a opačné změny aktivity $\Delta 5D$ jsou popisovány jako důsledek charakteristické alterace přeměny mastných kyselin u MetS (Žák A. et al., 2007; Žák A. et al., 2014; Tosi F. et al., 2014). Aktivita SCD-1 (resp. $\Delta 9D$) je ovlivněna genetickými faktory, činiteli zevního prostředí i chorobnými stavy (Merino D.M. et al., 2011; Mauvoisin D. a Mounier C., 2011). Zvýšené aktivity $\Delta 9D$ jsou spojeny s dyslipidemií, ischemickou chorobou srdeční, jsou prediktorem hyperglykémie a manifestace DM 2. typu (Warensjö E. et al., 2008; Mahendran Y. et al., 2014) a byly nalezeny u osob s depresí, které vykazují některé rysy insulinové rezistence (Vařeka T. et al., 2012), karcinomu jícnu (Zemanová M. et al., 2016) a chronické pankreatitidy (Zeman M. et al., 2016). Zvýšení aktivity $\Delta 9D$ zvyšuje riziko některých nádorů (Byberg L. et al., 2014),

obezity, distribuce tukové tkáně, insulinové rezistence (Warensjö E. et al., 2007) i prevalence MetS (Gong J. et al., 2011). Zvýšené aktivity D6D jsou asociovány s hyperinsulinémií a vyšším BMI, naopak nízké aktivity D5D, specifické pro MetS, nejsou závislé na BMI a fyzické aktivitě (Warensjö E. et al., 2006), a predikují rozvoj abdominální obezity (Kawashima A. et al., 2009).

Vysoké aktivity $\Delta 6D$ a nízké $\Delta 5D$ jsou charakteristické pro stavy asociované s insulinovou rezistencí (Kröger J. a Schulze M.B., 2012), predikují vznik DM a MetS (Saito E. et al., 2013). Překvapujícím nálezem bylo zjištění vyšší aktivity $\Delta 9D18$ ve skupině s nižší koncentrací apoB-48. Kyselina olejová je na rozdíl od kyseliny palmitolejové hojně zastoupena ve stravě a tak její koncentrace neodpovídají aktivitě SCD-1, ale reflektují také příjem OA potravinou.

12.1.3. Karcinom pankreatu

Karcinom pankreatu se řadí mezi nádorová onemocnění s nejvyšší mortalitou. V ČR se jeho incidence v roce 2016 pohybovala kolem 22,5 osob na 100 000 obyvatel (Zdravotnická statistika, 2016). Jeho pathogeneze je multifaktoriální. Předpokládá se, že se na rozvoji KP podílí genetické faktory, věk, stávající onemocnění (chronická pankreatitida, DM, obesita, insulinová rezistence), OS, životní styl a prostředí. Riziko rozvoje KP nejvíce zvyšují kouření (o 25-30 %), stravovací návyky (cca o 20 %), diabetes mellitus (o 9 %) a nadměrná konzumace alkoholu (o 3 %); (Harris D. M. et al., 2006; Hassan M. M., 2007). Neustále narůstá počet studií, které ukazují, že porušení lipidového metabolismu je spojeno nejen s metaboickými poruchami a kardiovaskulárními onemocněními, ale i s mnohými karcinomy. Nádorové buňky mají totiž mnohem větší potřebu přísunu lipidů (FA, cholesterol, TAG) než zdravé buňky, což je dáno jejich rychlou proliferací (Nishi K. et al., 2016).

Naše studie s pacienty s KP byla zaměřena na profil FA ve všech lipidových třídách (PL, CE, TAG) a koncentraci NEFA. Profil FA ve fosfolipidech a cholesterolsterech odráží jak jejich příjem potravinou za posledních 6 týdnů resp. 3 měsíce, tak jejich metabolismus (syntézu *de novo*, beta-oxidaci, desaturaci, elongaci), (Riccardi G. et al., 2004). V profilu FA byly největší rozdíly mezi KP a KON pozorovány ve třídě fosfolipidů.

V mnohých studiích bylo prokázáno, že zvýšená konzumace SFA vede ke zvýšení rizika rozvoje KP (Howe G.R. a Burch J.D., 1996; Stolzenberg-Solomon R.Z. et al., 2002; Thiebaut A.C. et al., 2009). V naší studii měli pacienti s KP zvýšený podíl jak SFA, tak

MUFA oproti KON. Nárůst SFA a MUFA byl podmíněn nárůstem hladin kyselin palmitové, palmitoolejové, olejové a elaidové.

Zvýšený podíl MUFA je považován za průkaz lipogeneze *de novo*, kdy u maligních tumorů bývá biosyntéza FA *de novo* indukována prostřednictvím aktivace exprese synthasy FA a $\Delta 9$ -desaturasy kyseliny stearové (Lupu R. a Menendez J.A., 2008; Flowers M.T. a Ntambi J.M., 2008). V naší studii jsme prokázali zvýšené aktivity obou $\Delta 9$ desaturas (kyseliny palmitové i stearové) jak v PL, tak v CE u pacientů s KP oproti KON. Studie s inhibitory synthasy FA ukázala, že inhibice syntézy FA, zvyšuje apoptózu nádorových buněk pankreatu (Nishi K. et al., 2016).

U pacientů s KP byl pozorován pokles podílu jak n-6 tak n-3 PUFA oproti KON. Z n-6 PUFA byla snížena hlavně hladina kyseliny linolové, dále byly nižší i hladiny kyselin γ -linolenové a dihomog γ -linolenové; z n-3 PUFA byly sníženy hladiny kyselin α -linolenové a EPA. Snížené hladiny PUFA by mohly být podmíněny zvýšeným oxidačním stresem a lipoperoxidací, sníženým příjmem PUFA potravou, či jejich sníženou malabsorpcí. I když Pratt ve své studii ukázal, že snížený podíl kyseliny linolové či α -linolenové u pacientů v pokročilém stádiu rakoviny není dán vlivem diety (Pratt V.C. et al., 2002).

Lidské nádorové buňky pankreatu jsou schopné v sobě velmi dobře akumulovat mastné kyseliny EPA a DHA. Bylo zjištěno, že tyto dvě FA vyvolávají akumulaci ROS, což následně vede ke kaspasou-8 indukované buněčné smrti nádorových buněk (Fukui M. et al., 2013).

Pacienti s KP měli signifikantně zvýšené koncentrace NEFA oproti KON. Na základě dat získaných z Pařížské prospektivní studie, bylo zjištěno, že zvýšená hladina NEFA silně koreluje s mortalitou pacientů s rakovinou a koncentrace NEFA by se tak mohla stát prediktorem přežití u pacientů s nádorem (Charles M.A. et al., 2001).

12.1.4. Chronická pankreatitida

Chronická pankreatitida je onemocnění charakterizované velmi rychle postupujícím a nevratným poškozením jak endokrinní tak exokrinní části pankreatu. Hlavní příčinou rozvoje ChP je zánětem podmíněná fibrosa pankreatu. Fibrotická přestavba pankreatu způsobuje nevratné poškození a vede k funkčnímu omezení pankreatu, což může mít za následek malnutrici či diabetes. Chronická pankreatitida je onemocnění s multifakturuální

etiologií, nejčastější příčinou je nadměrná konzumace alkoholu, dále hrají roli genetické faktory, pankreatická obstrukce, či akutní pankreatitida (Mumiraj T. et al., 2014).

Existuje stále více studií, které ukazují, že mnoho jak chronických, tak akutních onemocnění je spojeno s dysregulací lipidového metabolismu – konkrétně s dysregulací metabolismu FA. V naší studii jsme se zaměřili na změny v profilu FA u pacientů s ChP.

Mezi pacienty s ChP a KON nebyl pozorován rozdíl v hladinách jednotlivých SFA či v sumě SFA. Dříve publikované výsledky u pacientů s ChP jsou v tomto ohledu nejednotné, některé studie ve shodě s naší studií nenašly rozdíl v podílu jednotlivých SFA i sumy SFA (Nakamura, 1995), v další studii byly nalezeny zvýšené podíly kyselin palmitové a stearové i sumy SFA (Marosvolgyi T. et al., 2010) a existuje i studie, která popisuje pokles podílu stearové kyseliny a SFA s velmi dlouhým řetězcem u pacientů s ChP (Quilliot P. et al., 2003).

Pacienti s ChP měli signifikantně zvýšený podíl sumy MUFA i zastoupení všech jednotlivých MUFA. Toto zvýšení podílu jednotlivých MUFA i sumy MUFA u pacientů s ChP bylo pozorováno i v dalších studiích, které se zabývaly FA u pacientů s ChP (Quilliot P. et al., 2003; Marosvolgyi T. et al., 2010). Zvýšený podíl MUFA je považován za průkaz lipogeneze *de novo*.

Naproti tomu bylo pozorováno snížené zastoupení jak n-6 tak n-3 PUFA; z PUFA n-6 bylo výrazně sníženo zastoupení kyseliny linolové, z PUFA n-3 potom byl snížen podíl kyseliny DHA. Snížený podíl kyseliny linolové u ChP pacientů ve srovnání s KON byl pozorován ve všech dalších studiích (Nakamura T. et al., 1995; Quilliot P. et al., 2003; Marosvolgyi T. et al., 2010), i když ne vždy dosáhlo significance snížené zastoupení všech PUFA n-6 u ChP oproti KON (Quilliot P. et al., 2003). Na rozdíl od jiných studií (Nakamura T. et al., 1995; Marosvolgyi T. et al., 2010) jsme nenalezli rozdíly v hladinách kyseliny arachidonové mezi ChP a KON.

Námi sledovaný pokles n-3 PUFA není v souladu s dříve publikovanými výsledky, dvě předcházející studie s ChP pacienty nepozorovaly rozdíly v podílu n-3 PUFA mezi ChP a KON (Quilliot P. et al., 2003; Marosvolgyi T. et al., 2010), v další studii dokonce našli zvýšené zastoupení některých n-3 PUFA u pacientů s ChP, což autoři vysvětlovali zvýšenou konzumací rybího oleje ve spojení s nízkým příjmem tuků z potravy (Nakamura T. et al., 1995).

Pacienti s ChP měli zvýšenou aktivitu obou $\Delta 9$ desaturas (jak desaturasu kyseliny palmitové tak stearové), a i $\Delta 5$ a $\Delta 6$ desaturasy v porovnání s KON. Aktivita $\Delta 9$ desaturas je ovlivňována mnoho faktory, zvyšuje jí dieta bohatá na sacharidy – glukosa, fruktosa, dále pak cholesterol, insulin či některé léky, naopak snížení způsobují n-6 a n-3 PUFA a některé prozánětlivé cytokiny (Miyazaki M. a Ntambi J.M., 2003). Opačně působí n-3 PUFA na D6D, kdy snížení podílu PUFA n-3 má za následek snížení exprese D6D a její aktivity (Hofacer R. et al., 2011).

12.2. Profil lipoproteinových částic

12.2.1. Konečné stádium onemocnění ledvin

Studie zabývající se profilem lipoproteinových částic (LDL a HDL) u pacientů v konečném stádiu onemocnění ledvin ukázala některé pro tyto pacienty specifické změny v základních lipidových biochemických parametrech, jako jsou snížené koncentrace celkového cholesterolu, podmíněné jak sníženou hladinou HDL tak LDL cholesterolu a zvýšené koncentrace TAG.

Dále byly zjištěny některé signifikantní rozdíly v profilu lipoproteinových částic, kdy pacienti s ESRD ve srovnání se zdravými kontrolami měli signifikantně zvýšený obsah cholesterolu ve VLDL a IDL částicích a to na úkor nižšího zastoupení cholesterolu ve velkých LDL částicích. Rozdíly byly pozorovány i v profilu HDL částic, kdy pacienti s ESRD měli změněný profil HDL ve prospěch velkých HDL částic. Námi získané výsledky jsou srovnatelné s dříve publikovanými studiemi (Rysz-Górzyńska M. et al., 2017; Gluba-Brzózka A. et al., 2017). Se zvýšeným obsahem cholesterolu ve VLDL a IDL částicích je u hemodialyzovaných pacientů spojováno zvýšené riziko KVO (Shoji T. et al., 1998). Příčinou zvýšeného zastoupení IDL a VLDL frakce může být jejich nedostatečné odbourávání způsobené nízkou aktivitou lipoproteinlipasy a/nebo snížené vychytávání remnant prostřednictvím jaterních LDL receptorů (Saland J.M. a Parekh R.S., 2010).

Velké HDL částice by podle mnohých autorů měly mít ateroprotektivní charakter (Martin S.S. et al., 2014). Je ovšem prokázáno, že velké HDL částice mají podstatně nižší schopnost vychytávat cholesterol než malé HDL (Movva R. a Rader D.J., 2008). Přesto se malé HDL částice ukázaly být u hemodialyzovaných pacientů nezávislým prediktorem úmrtí na KVO (Vekic J. et al., 2011).

12.2.2. Pacienti se zvýšenou hladinou apoB-48

Osoby s vyšší koncentrací apoB-48 vykazovaly vyšší koncentrace sd-LDL a vyšší podíl *fenotypu B* velikosti LDL. *Fenotyp B* velikosti LDL (převaha sd-LDL) je dyslipidemickou komponentou MetS. Metabolickým prediktorem sd-LDL jsou koncentrace TAG a aktivita jaterní lipasy (Ng D.S., 2013; Diffenderfer M.R. a Schaefer E.J., 2014). Vzhledem k tomu TRL jaterního původu (VLDL, IDL) a střevního původu (CM a CMr) kompetují o stejný lipolytický systém (lipoproteinovou a jaterní lipasu) a receptory vychytávající IDL a CMr, tak vzestup TAG je spojen s prodloužením rezidenčního času TRL. Tímto mechanismem lze vysvětlit významné námi zjištěné pozitivní korelace mezi hladinami apoB-48 na straně jedné, a koncentracemi TAG a sd-LDL na straně druhé, a negativní korelace apoB-48 s HDL-C, které byly popsány i jinými autory (Sato I. et al., 2009).

12.3. Lipidové parametry oxidační rovnováhy

Udržení oxidační rovnováhy organismu je zajišťováno antioxidačním systémem, který je tvořený antioxidačními enzymy – SOD, KAT, GPX, GR a PON – a neenzymovými antioxidanty, kde nejdůležitějším je GSH (Racek J. a Holeček V., 1999). Antioxidantem výrazně spojeným s lipidy je antioxidační enzym paraoxonasa 1, která je v krevní plazmě transportována vázána v HDL částici a to prostřednictvím apoA-I. PON1 hraje důležitou roli v ochraně částic LDL před působením volných radikálů.

Porušení oxidační rovnováhy má za následek rozvoj OS. K porušení oxidační rovnováhy vede nedostatečná funkce antioxidačního systému a/nebo nadměrná produkce RONS. Reaktivní formy kyslíku a dusíku se pak uplatňují v patogenezi mnoha onemocnění, neb jejich působením dochází k poruše buněčné homeostázy, k poškození DNA a k peroxidaci membránových lipidů s následným zvýšením permeability a k buněčné smrti (Špičák J., 2000). Za lipidové markery oxidačního stresu je možné považovat hladiny KD v precipitovaných LDL částicích a hladiny ox-LDL částic. Koncentrace KD/LDL odráží hladiny minimálně modifikovaných LDL částic, kde je modifikována pouze jejich lipidová složka (Esterbauer H. et al., 1992, Ahotupa M. et al., 1996). Hladiny ox-LDL/LDL představují částice LDL, ve kterých je zoxidována jak lipidová, tak proteinová složka částice (Liao F. et al., 1994).

12.3.1. Metabolický syndrom

U pacientů s MetS byla zjištěna zvýšená koncentrace KD/LDL oproti KON, kdy hladiny jednotlivých komponent MetS signifikantně korelovaly s hladinou KD/LDL. Dále bylo zjištěno, že hladina KD/LDL se zvyšovala s počtem přítomných komponent MetS. Tyto výsledky jsou ve shodě s dříve publikovanými studiemi, které se zabývaly závažností MetS ve vztahu k oxidačnímu stresu (Žák A. et al., 2007; Zeman M. et al., 2002).

Hladina KD/LDL je považována za jeden z nejcitlivějších indikátorů lipidové peroxidace a může být považována za marker systémového oxidačního stresu (Güzel S. et al., 2000). Oxidační stres je spojen s nadprodukcí RONS a/nebo s nedostatečnou kapacitou antioxidačního systému organismu. Za fyziologických podmínek produkuje organismus jen malé množství RONS. Nadprodukce superoxidového anion radikálu může být podmíněna hyperglykemií a s ní spojeným nedostatkem elektronů v mitochondriích (Yamagishi S.I. et al., 2001), zvýšenou aktivitou NAD(P)H oxidasy (Paravicini T.M. a Touyz R.M., 2008), xanthioxidasy, lipoxygenasy či cyklooxygenasy nebo nerovnováhou thioredoxinového systému (Nordberg J. a Arnér E.S., 2001).

Tuková tkáň je důležitým generátorem oxidačního stresu a zánětu, přispívá k produkci prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-1, IL-6). Velké množství superoxidu a dalších RONS vzniká v akumulované tukové vrstvě, převážně z důvodu zvýšené aktivity NADPH oxidasy a snížené exprese antioxidačních enzymů (Furukawa S. et al., 2004). Předpokládá se, že OS zhoršuje zánět u pacientů s MetS prostřednictvím aktivace redox-senzitivních transkripčních faktorů – obzvláště NFκB.

U pacientů s MetS oproti KON byla krom zvýšených hladin KD/LDL dále pozorována snížená arylesterasová aktivita s lipidy asociovaného antioxidačního enzymu PON1. Snížená aktivita PON1 u pacientů s MetS byla nalezena i v dalších studiích (Garin M.C. et al., 2005; Rizos E. et al., 2005; Hashemi M. et al., 2011; Kappelle P.J. et al., 2011; Martinelli N. et al., 2012). Avšak výsledky jiných studií nejsou konzistentní, v některých studiích nebyly pozorovány rozdíly v arylesterasové aktivitě PON1 mezi pacienty s MetS a KON (Lagos K. G. et al., 2009; Tabur S. et al., 2010; Yilmaz H. et al., 2010; Ciumărnean L. et al., 2015) a v dalších studiích zase byla nalezena zvýšená arylesterasová aktivita PON1 u MetS (Eren E. et al., 2014).

Předpokládá se, že existuje několik různých mechanismů, které mohou vést k poklesu aktivity PON 1. Jednou z možných příčin je záměna PON1 za SAA ve vazbě na apo-A1

v HDL částicích (James R. W. a Deakin S. P., 2004). Další možností, kdy dochází k deaktivaci PON1, je zvýšený oxidační stres spojený se zvýšenými hladinami ox-LDL/LDL. Oxidované LDL nejspíše interagují s volnými thiolovými skupinami PON1, čímž enzym deaktivují (Aviram M. et al., 1996). PON1 je deaktivována též glykací, která probíhá u pacientů s hyperglykemií a diabetem mellitu (Hedrick et al., 2000). K deaktivaci PON1 může dále vést akutní zánětlivá odpověď organismu, kdy je utlumena jaterní syntéza enzymu (Deakin SP. a James RW., 2004).

U pacientů s MetS byla dále zjišťována závislost aktivity PON1 na počtu komponent MetS a bylo zjištěno, že u osob, které splňovaly všech 5 komponent MetS byla aktivita PON1 signifikantně nižší než u osob pouze se 3 komponentami MetS. Což spolu se zvyšováním hladin KD/LDL s rostoucím počtem přítomných komponent MetS nasvědčuje prohlubujícímu se oxidačnímu stresu se stoupající závažností onemocnění.

12.3.2. Pacienti se zvýšenou hladinou apoB-48

Koncentrace KD/LDL a ox-LDL reflektují systémový oxidační stress. Zatímco KD/LDL jsou ukazatelem mm-LDL, jejichž částice mají modifikovanou pouze lipidovou složku, tak ox-LDL představují částice, ve kterých je oxidačně modifikovaná jak lipidová, tak bílkovinná složka (Ahotupa M. et al., 1996; Esterbauer H. et al., 1992). Naše výsledky implikují, že oxidační stres je více vyjádřen u žen než u mužů ve skupinách s vyšší koncentrací apoB-48. Je známo, že snížená účinnost antioxidačního systému je komplexním dějem, který je závislý na genetických faktorech, stavu výživy, intenzitě metabolismu a koncentraci pohlavních hormonů. Estrogeny zvyšují expresi antioxidačních enzymů a *per se* mají antioxidační vlastnosti (Kodydková J. et al., 2014; Giergiel M. et al., 2012). Muži s vyšší koncentrací apoB-48, měli na rozdíl od žen, vyšší insulinemii a index HOMA-IR. Změny insulinové rezistence souvisí s pohlavně-specifickými rozdíly v množství i distribuci tukové tkáně v jednotlivých oddílech tukové tkáně, s bazální a stimulovanou lipolýzou, vychytáváním NEFA, skladováním TAG i insulinovou rezistencí. Muži, na rozdíl od žen, mají vyšší stupeň insulinové rezistence, a oxidují více mastných kyselin (Varlamov O. et al., 2015). Nicméně, nenalezli jsme signifikantní rozdíly v koncentraci NEFA ani v celé skupině, ani při hodnocení zvlášť mužů a žen s rozdílnou koncentrací apoB-48.

12.3.3. Karcinom pankreatu

U pacientů s KP byly pozorovány zvýšené hladiny obou sledovaných markerů oxidačního stresu, tedy jak KD/LDL tak ox-LDL/LDL. Hladina KD/LDL byla závislá na stádiu onemocnění – čím pokročilejší stádium nádorového onemocnění, tím byla vyšší hladina KD/LDL. K dnešnímu dni nebyly publikovány žádné výsledky dalších studií, které by se zabývaly hladinami KD/LDL a ox-LDL/LDL u pacientů s KP. Zvýšená lipidová peroxidace u KP pacientů však byla v mnoha studiích prokázána prostřednictvím jiných markerů lipidové peroxidace, jako jsou např. malondialdehyd, 4-hydroxynonenal, lipidové hydroperoxydy či reaktivní substance na bázi tiobarbiturátů (Leung P.S. a Chan X.C., 2009; Czczot H. et al., 2010).

U pacientů s KP byla pozorována snižená jak arylerasová, tak laktonasová aktivita PON1, což je ve shodě s dříve publikovanou studií (Akçay M.N. et al., 2003). Jednou z možných příčin snížení aktivity PON1 je její vyvázání z vazby na apoA-I v HDL částicích, kdy je PON1 nahrazena SAA. V naší studii byly pozorovány zvýšené koncentrace SAA u pacientů s KP a byla pozorována negativní korelace mezi aktivitou PON1 a koncentrací SAA. Stejně tak byly pozorovány zvýšené koncentrace SAA u KP pacientů v dalších studiích (Yokoi K. et al., 2005; Firpo M.A. et al., 2009).

Bylo prokázáno, že SAA je zapojen v karcinogenezi, je spojen s růstem nádoru a s jeho další progresí (tvorba metastáz), neboť stimuluje migraci nádorových buněk. SAA stimuluje jednak svou vlastní transkripci, jednak transkripci prozánětlivých proteinů jako jsou S100A8 a S100A9 (Malle E. et al., 2009; Hansen M.T. et al., 2015).

12.3.4. Chronická pankreatitida

Pacienti s ChP měli signifikantně zvýšené hladiny KD/LDL a ox-LDL oproti KON. Tyto výsledky jsou ve shodě se studií Schoenberga a kol. (Schoenberg M.H. et al., 1995), zatímco Santini a kol. nenašli žádné signifikantní rozdíly mezi ChP a KON v sérových koncentracích KD/LDL. Santini a kol dále analyzovali množství KD/LDL v pankreatické šťávě a pacienti s ChP měli vyšší hladiny KD/LDL v pankreatické šťávě než KON (Santini S.A. et al., 2003).

Aktivity PON1 jak arylerasová tak laktonasová byly u ChP snižené oproti KON. Aktivitou PON1 u ChP pacientů se zabývala pouze studie Zhanga a Lina (Zhang L. a Lin B., 2013), kteří měřili paraoxonasovou aktivitu PON1 a ve shodě s naší studií našli snížené aktivity PON1 u pacientů s ChP ve srovnání s KON. Nárůst koncentrace SAA

u ChP nedosáhl signifikantního významu, lze hovořit pouze o trendu zvýšených koncentrací SAA u ChP v porovnání s KON.

13. Závěr

Výsledky naší práce ukazují, že užití pokročilé lipidomiky, která spojuje vyspělé analytické biochemické metody s různými metodami multivariační analýzy, vede k získání dat, která mají potenciál detekovat biomarkery, charakterizující klíčové pochody v patogenezi závažných onemocnění, jakými jsou např. metabolický syndrom nebo karcinom pankreatu.

Získali jsme následující údaje:

U osob s přítomnými rysy MetS bylo složení FA v plazmatických PL asociováno s ukazateli adipozity (index pas/boky, procento tuku, tuková hmota). Ukazatele adipozity byly pozitivně asociovány s hladinami kyseliny palmitové, stearové, dihomogamma-linolenové, α -linolenové a eikosapentaenové, zatímco negativní asociace byly nalezeny v případě kyseliny olejové, linolové a dokosapentaenové.

S použitím clusterové analýzy bylo možno osoby s metabolickým syndromem rozdělit do dvou skupin, z nichž skupina spojená s vyšším kardiometabolickým rizikem byla charakterizována vyšším obsahem kyseliny palmitolejové, γ -linolenové a dihomogamma-linolenové a nižším obsahem kyseliny linolové.

Při studiu významu zvýšených koncentrací apoB-48 pro kardiometabolické riziko jsme u osob se zvýšenou koncentrací apoB-48 našli asociaci apoB48 s vyšším systolickým krevním tlakem, odlišným lipidovým profilem, insulinovou rezistencí i oxidačním stresem.

Při použití multivariační lineární diskriminační analýzy jsme u pacientů s ChP našli pokles vícenenasycených (PUFA) n-6 mastných kyselin a současně zvýšený podíl monoenoových mastných kyselin, což korespondovalo se zvýšenou hodnotou indexu palmitolejová/linolová mastná kyselina, který je užíván jako marker deficiencie esenciálních mastných kyselin. Současně byl pozorován vzestup indexu aktivity $\Delta 9$ a $\Delta 6$ desaturasy (D6D) se současným poklesem D5D. Změny jsou pravděpodobně důsledkem sníženého příjmu PUFA v potravě v kombinaci s alterací systému desaturas.

U nemocných s KP jsme našli zvýšenou aktivitu enzymu D9D (SCD-1) a D5D a zvýšený podíl MUFA ve všech lipidových třídách plazmy. Přežití nemocných korelovalo s nižším indexem SCD-1 a se zvýšeným podílem EPA a DHA. Navíc celkové n-3 PUFA, kyselina α -linolenová a EPA vykazovaly negativní trend se stagingem nádoru.

Výsledky multivariační lineární diskriminační analýzy ukázaly, že kombinace hodnot laktonasové aktivity PON1, aktivity KAT a hladiny ox-LDL/LDL umožňuje odlišení pacientů s KP od pacientů s ChP s úspěšností 83%.

U všech sledovaných onemocnění byla pozorována zvýšená hladina KD/LDL u KP a ChP pak navíc i hladina indexu ox-LDL/LDL. Naproti tomu aktivita PON1 byla u všech sledovaných onemocnění nalezena snižena, což ukazuje na spojení sledovaných onemocnění s oxidačním stresem.

14. Souhrn

Poruchy metabolismu lipidů jsou rizikovými faktory kardiovaskulárních, metabolických a nefrologických onemocnění i některých nádorů. Pro snížení kardiovaskulární mortality a zlepšení prognózy těchto pacientů se v současnosti věnuje značné úsilí studiu nových rizikových faktorů a surogátních markerů patogeneze těchto chorob. Cílem disertační práce bylo podat ucelený přehled o lipidové problematice, o vlastnostech, funkci a metabolismu lipidů za fyziologických a různých patologických stavů a o možnosti využití vybraných lipidových parametrů v diagnostice těchto patologických stavů. Vybrané lipidové parametry byly sledovány v několika různých studiích zaměřených na konkrétní patologickou jednotku. Kromě konvenčních lipidových parametrů bylo sledováno zastoupení mastných kyselin, a to u zdravých kontrol a dále u pacientů s metabolickým syndromem, chronickou pankreatitidou a karcinomem pankreatu. Markery oxidačního stresu (oxidačně modifikované LDL a konjugované dieny v precipitovaných LDL) a aktivita paraoxonasy 1 byly opět měřeny u zdravých kontrol, u osob s metabolickým syndromem, u probandů s různou koncentrací apoB-48 a u pacientů s chronickou pankreatitidou a karcinomem pankreatu. Stanovení subfrakcí částic LDL bylo provedeno u zdravých kontrol, pacientů s konečným stádiem onemocnění ledvin a u pacientů s různou koncentrací apolipoproteinu B-48. V rámci pokročilé lipidomiky byla získaná data vyhodnocena mnohorozměrnou statistickou analýzou, která zahrnovala clusterovou analýzu, diskriminační analýzu či multifaktorovou regresní analýzu. Výsledky prací, obsažených v této disertaci, ukazují, že užití pokročilé lipidomiky, která spojuje vyspělé analytické biochemické metody s různými metodami mnohorozměrné statistiky může poskytnout řadu dat, mezi kterými je možno nalézt biomarkery klíčových pochodů v patogenezi výše uvedených onemocnění.

15. Summary

Abnormalities of lipid metabolism are considered risk factors for cardiovascular, metabolic, nephrologic diseases and some malignancies, as well. Nowadays, a lot of effort is devoted to study new risk factors and surrogate markers of conditions mentioned above to improve their prognosis and decrease mortality. The aim of this thesis was to provide a comprehensive survey of lipid metabolism, characteristics of different lipid compounds in health and diseases and of possibilities of utilization of selected lipid parameters in the diagnostics of pathological conditions listed above. Selected lipid parameters were observed in several studies, focused on specific pathological conditions. Besides conventional lipid analytes, the composition of fatty acids in plasma lipid pools was studied in healthy controls, and in the patients suffering from metabolic syndrome, chronic pancreatitis, and pancreatic cancer, as well. Markers of an oxidative stress (oxidatively modified LDL particles and conjugated dienes in precipitated LDL) were assessed in healthy controls, patients with metabolic syndrome, chronic pancreatitis, pancreatic cancer, and in the patients with different concentrations of plasma apoB-48, too. LDL particles subfraction were investigated in healthy controls, in the patients with different concentrations of plasma apoB-48 a and in the persons suffering from end-stage renal disease. The obtained data were evaluated using multivariate statistical analytic techniques (linear diskriminant analysis, factor analysis, cluster analysis). The results of works, that were included in this thesis have shown that application of advanced lipidomics, using both sophisticated analytical biochemical methods and different multivariate statistical analyses, can provide plenty of data, enabling us to find biomarkers of key steps in pathogenesis of abovementioned pathological conditions.

16.Literatura

Ahotupa M, Ruutu M, Mantyla E: Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem* 1996; 29: 139-144.

Akçay MN, Polat MF, Yilmaz I, Akçay G: Serum paraoxonase levels in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 50 Suppl 2: ccxxv-ccxxvii.

Akosah KO, Schaper A, Cogbill C, Schoenfeld P: Preventing myocardial infarction in the young adult in the first place: how do the national cholesterol education panel iii guidelines perform? *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1475-9.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059–1062.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: The metabolic syndrome – a new worldwide definition. A consensus Statement from the International Diabetes Federation *Diabet Med* 2006; 23: 469-480.

Alipour A, Valdivielso P, Elte JW, et al: Exploring the value of apoB48 as a marker for atherosclerosis in clinical practice. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 702-708.

de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Hidalgo G, et al: Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002; 21: 219-23.

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM: Low-density lipoprotein subclass pattern and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260: 1917-1921.

Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al: Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1996; 26: 892-904.

Bagnardi V, Rota M, Botteri E, et al: Light alcohol drinking and cancer: A meta.analysis. *Ann Oncol* 2013; 24: 301-308.

Bahmanyar S, Ye W: Dietary patterns and risk of squamous-cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia: A population based case-control study in Sweden. *Nutr Cancer* 2006; 54: 171-178.

Badid N, Ahmed FZ, Merzouk H, et al: Oxidant/antioxidant status, lipids and hormonal profile in overweight women with breast cancer. *Pathol Oncol Res* 2010; 16: 159-167.

Balci H, Genc H, Papila C, et al: Serum lipid hydroperoxide levels and paraoxonase activity in patients with lung, breast, and colorectal cancer. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 155-160.

Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ: Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Lett* 2008; 269: 363-377.

Berneis KK, Krauss RM: Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002;43:1363-79.

Bradley RL, Fisher FF, Maratos-Flier E: Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 938-44.

Bravi F, Edefonti V, Randi G, et al: Dietary patterns and the risk of esophageal cancer. *Ann Oncol* 2012; 23: 765-70.

Byberg L, Kilander L, Warensjö Lemming E, et al: Cancer death is related to high palmitoleic acid in serum and to polymorphisms in the SCD-1 gene in healthy Swedish men. *Am J Clin Nutr* 2014; 99: 551-8.

Cao H, Gerhold K, Mayers JR, et al: Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 2008; 134: 933-44.

Carlson LA: Extraction of Lipids from Tissues. *Clinica Chimica Acta* 1985; 149: 89-93.

Ciumărnean L, Dronca E, Vesa ȘC, et al: Paraoxonase 1 genotype-phenotype correlation in patients with metabolic syndrome. *Rom J Morphol Embryol* 2015; 56: 387-392.

Criddle DN, Murphy J, Fistetto G, et al: Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 781-793.

Czeczot H, Scibior-Bentkowska D, Skrzycki M, et al: Assessment of lipid peroxidation level in serum of patients with gastrointestinal tract tumors. *Wiad Lek* 2010; 63:180-187.

Deakin SP, James RW: Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 435-47.

- Diakowska D, Lewandowski A, Kopec W, et al: Oxidative DNA damage and total antioxidant status in serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1701-1704.
- Diffenderfer MR, Schaefer EJ: The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25: 221-6.
- Dodani S, Grice DG, Joshi S: Is HDL function as important as HDL quantity in the coronary artery disease risk assessment? *J Clin Lipidol* 2009; 3: 70-7.
- Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, et al: Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a highdensity lipoprotein-associatedlactonase and protectslowdensity lipoprotein againstoxidation. *J Biol Chem* 2000; 275: 33435-42.
- Dušejevská M, Staňková B, Vecka M, et al: Lipid Metabolism in Patients with End-Stage Renal Disease: A Five Year Follow-up Study. *Curr Vasc Pharmacol* 2018; 16: 298-305.
- Dušejevská M: Velikost jednotlivých lipoproteinových částic u různých patologických stavů. Praha: 1. LF UK, Disertační práce 2017.
- Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 1126-38.
- Eren E, Abuhandan M, Solmaz A, Taşkın A: Serum paraoxonase/arylesterase activity and oxidative stress status in children with metabolic syndrome. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2014; 6: 163-68.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puh H, Jürgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-90.
- Firpo MA, Gay DZ, Granger SR, et al: Improved diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using haptoglobin and serum amyloid A in a panel screen. *World J Surg* 2009; 33: 716-22.
- Flowers MT, Ntambi JM: Role of stearoyl-Coenzym A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 248-256.
- Folch J, Lees M, Stanley, GHS: Isolation of Total Tissue Lipids. *The Journal of Biological Chemistry* 1957; 226: 497-509.

Fukui M, Kang KS, Okada K, Zhu BT: EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. *J Cell Biochem* 2013; 114: 192-203.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-1761.

Garin MC, Kalix B, Morabia A, James RW: Small dense lipoprotein particles and reduced paraoxonase-1 in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2264-2269.

Ghosh A, Gao L, Thakur A, et al: Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci* 2017; 24:50.

Giergiel M, Lopucki M, Stachowicz N, et al: The influence of age and gender on antioxidant enzyme activities in humans and laboratory animals. *Aging Clin Exp Res* 2012; 24: 561-569.

Gluba-Brzózka A, Franczyk B, Bartnicki P, et al: Lipoprotein subfractions, uric acid and cardiovascular risk in end-stage renal disease (ESRD) patients. *Curr Vasc Pharmacol* 2017; 15: 1-12.

Gong J, Campos H, McGarvey S, et al: Genetic variation in stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with metabolic syndrome prevalence in Costa Rican adults. *J Nutr* 2011; 141: 2211–2218.

Goswami B, Rajappa M, Gupta N, et al: Breast cancer: interaction between oxidant-antioxidant dynamics and inflammation in Indian females. *Cancer Biomark* 2010; 6: 95-103.

Greenland P, Smith SC Jr, Grundy SM: Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. *Circulation* 2001; 104: 1863-1867.

Güzel S, Seven A, Satman I, Burcak G: Comparison of oxidative stress indicators of recent-onset and long term type I diabetic patients. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 59: 7-14.

Hansen MT, Forst B, Cremers N, et al: A link between inflammation and metastasis: serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4. *Oncogene* 2015; 34: 424-435.

Hansen-Petrik MB, McEntee MF, Johnson BT, et al: Selective inhibition of delta 6 desaturase impedes intestinal tumorigenesis. *Cancer Lett* 2002; 175: 157-163.

Hardy S, Langelier Y, Prentki M: Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 2000; 60: 6353-6358.

Harris DM, Champaneria M, Go VLW: Pancreatic cancer. In: Heber D, Blackburn GL, Milner JA (eds.): *Nutritional Oncology*. San Diego, CA: Academic Press 2006; 449-473.

Hashemi M, Kordi-Tamandani DM, Sharifi N, et al: Serum paraoxonase and arylesterase activities in metabolic syndrome in Zahedan, southeast Iran. *Eur J Endocrinol* 2011; 164: 219-222.

Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, et al: Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2696-2707.

Hayashi T, Hirano T, Taira T, et al: Remarkable increase of apolipoprotein B48 level in diabetic patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 2008; 197: 154-158.

He C, Qu X, Wan J, et al: Inhibiting delta 6 desaturase activity suppresses tumor growth in mice. *PloS One* 2012; 7: e47567.

Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, et al: Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000; 43: 312-320.

Hofacer R, Jandacek R, Rider T, et al: Omega 3 fatty acid deficiency selectively up-regulates delta6-desaturase expression and activity indices in rat liver: prevention by normalization of omega 3 fatty acid status. *Nutr Res* 2011; 31: 715-722.

Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Bang H, et al: Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetologia* 2007; 50: 36-42.

Howe GR, Burch JD: Nutrition and pancreatic cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 69-82.

Charles MA, Fontbonne A, Thibault N, et al: High plasma nonesterified fatty acids are predictive of cancer mortality but not of coronary heart disease mortality: results from the Paris Prospective Study. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 292-298.

- Chen H, Tucker KL, Graubard BI, et al: Nutrient intakes and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Nutr Cancer* 2002; 42: 33-40.
- James RW, Deakin SP: The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1986-1994.
- Kappelle PJ, Bijzet J, Hazenberg BP, Dullaart RP: Lower serum paraoxonase-1 activity is related to serum amyloid A levels in metabolic syndrome. *Arch Med Res* 2011; 42: 219-225.
- Kawashima A, Sugawara S, Okita M, et al: Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and intakes of energy and nutrient in Japanese men with abdominal obesity or metabolic syndrome. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009; 55: 400-406.
- Kinoshita M, Ohnishi H, Maeda T, et al: Increased serum apolipoprotein B48 concentration in patients with metabolic syndrome. *J Atheroscler Thromb* 2009; 16: 517-522.
- Kodydková J, Vávrová L, Staňková B, et al: Changes in antioxidants and oxidative stress markers in pancreatic diseases. *Pancreas* 2013; 42: 614-621.
- Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, et al: Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)* 2014; 60:153-67.
- Králová Lesná I, Suchánek P, Brabcová E, et al: Effect of different types of dietary fatty acids on subclinical inflammation in humans. *Physiol Res* 2013; 62: 145-152.
- Kröger J, Schulze MB: Recent insight into the relation of $\Delta 5$ desaturase and $\Delta 6$ desaturase activity to the development of type 2 diabetes. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23: 4-10.
- Kröger J, Zietemann V, Enzenbach C: Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 127-142.
- Lagos KG, Filippatos TD, Tsimihodimos V, et al: Alterations in the high density lipoprotein phenotype and HDL-associated enzymes in subjects with metabolic syndrome. *Lipids* 2009; 44: 9-16.
- Leung PS, Chan XC: Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid. Redox Signal* 2009; 11: 135-165.

- Lee E, Lee S, Park Y: n-3 Polyunsaturated fatty acids and trans fatty acids in patients with the metabolic syndrome a case-control study in Korea. *Br J Nutr* 2008; 100: 609-614.
- Li J, Ding SF, Habib NA, et al: Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 1994; 57: 348-352.
- Liao F, Andalibi A, Qiao JH, et al: Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 877-884.
- Lottenberg AM, Afonso Mda S, Lavrador MS, et al: The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 1027-1040.
- Lupu R, Menendez JA: Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? *Endocrinology* 2008; 147: 4056-4066.
- Macášek J, Tvrzická E, Žák A: Apolipoproteiny – současný pohled. In: A. Žák a kol. *Ateroskleróza. Nové pohledy*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2011; 39-48.
- Macášek J, Vecka M, Žák A, et al: Plasma fatty acid composition in patients with pancreatic cancer: correlations to clinical parameters. *Nutr Cancer* 2012; 64: 946-955.
- Mahendran Y, Cederberg H, Vangipurapu J, et al: Glycerol and fatty acids in serum predict the development of hyperglycemia and type 2 diabetes in Finnish men. *Diabetes Care* 2013; 36: 3732-3738.
- Mahendran Y, Agren J, Uusitupa M, et al: Association of erythrocyte membrane fatty acids with changes in glycemia and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2014; 99: 79-85.
- Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A: Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 9-26.
- Marosvolgyi T, Horvath A, Dittrich A, et al: Fatty acid composition of plasma lipid classes in chronic alcoholic pancreatitis. *Pancreatology* 2010; 10: 580-585.
- Martin SS, Jones SR, Toth PP. High-density lipoprotein subfractions: current views and clinical practice applications. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25(7): 329-336.

Martinelli N, Micaglio R, Consoli L, et al: Low levels of serum paraoxonase activities are characteristic of metabolic syndrome and may influence the metabolic syndrome related risk of coronary artery disease. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 231502.

Masuda D, Nishida M, Arai T, et al: Reference interval for the apolipoprotein B-48 concentration in healthy Japanese individuals. *J Atheroscler Thromb* 2014; 21: 618-627.

Matsubara C, Nishikawa Y, Yoshida Y, Takamura K: A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase. *Anal Biochem* 1983; 130: 128-133.

Mauvoisin D, Mounier C: Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* 2011; 93: 78-86.

Mayneris-Perxachs J, Guerendiain M, Castellote AI, et al: Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease. *Clin Nutr* 2014; 33: 90-97.

Merino DM, Johnston H, Clarke S, et al: Polymorphisms in FADS1 and FADS2 alter desaturase activity in young Caucasian and Asian adults. *Mol Genet Metab* 2011; 103: 171-8.

Miyazaki M, Ntambi JM: Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 2003; 68: 113-121.

Mori K, Ishida T, Yasuda T, et al: Fasting serum concentration of apolipoprotein B48 represents residual risks in patients with new-onset and chronic coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2013; 421: 51-56.

Movva R, Rader DJ: Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem* 2008; 54: 788-800.

Mumiraj T, Aslanian HR, Farrell J, Jamidar PA: Chronic pancreatitis, a comprehensive review and update. Part I: epidemiology, etiology, risk factors, genetics, pathophysiology and clinical features. *Dis Mon* 2014; 60: 530-550.

Murphy RA, Bureyko TF, Mourtzakis M, et al: Aberrations in plasma phospholipid fatty acids in lung cancer patients. *Lipids* 2012; 47: 363-369.

Nakajima K, Nagamine T, Fujita MQ, et al: Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv Clin Chem* 2014; 64: 117-177.

- Nakamura T, Takebe K, Imamura K, et al: Changes in plasma fatty acid profile in Japanese patients with chronic pancreatitis. *J Int Med Res* 1995; 23: 27-36.
- Ng DS: Diabetic dyslipidemia: from evolving pathophysiological insight to emerging therapeutic targets. *Can J Diabetes* 2013; 37: 319-26.
- Nishi K, Suzuki K, Sawamoto J, et al: Inhibition of Fatty Acid Synthesis Induces Apoptosis of Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res* 2016; 36: 4655-4660.
- Nordberg J, Arnér ES: Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-1312.
- Norde MM, Oki E, Carioca AAF, et al: Influence of *IL1B*, *IL6* and *IL10* gene variants and plasma fatty acid interaction on metabolic syndrome risk in a cross-sectional population-based study. *Clinical Nutrition* 2018; 37: 659-66.
- Okuturlar Y, Gunaldi M, Kocoglu H, et al: Serum paraoxonase and arylesterase can be useful markers to predict neoadjuvant chemotherapy requirement in patients with breast cancer. *J Cancer Res Ther* 2018; 14: S362-S367.
- Paillard F, Catheline D, Duff FL, et al: Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18: 436-440.
- Paravicini TM, Touyz RM: NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31: S170-S180.
- Pohl H, Wrobel K, Bojarski C, et al: Risk factors in the development of esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 200-207.
- Pratt VC, Watanabe S, Bruera E, et al: Plasma and neutrophil fatty acid composition in advanced cancer patients and response to fish oil supplementation. *Br J Cancer* 2002; 87: 1370-1378.
- Quilliot D, Walters E, Böhme P, et al: Fatty acid abnormalities in chronic pancreatitis: effect of concomitant diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 496-503.
- Racek J, Holeček V: Vznik volných radikálů a enzymy. *Klin Biochem Metab* 1999; 7: 158-163.
- Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, et al: Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity (Edinb)* 2009; 102: 147-154.

Rajneesh CP, Manimaran A, Sasikala KR, Adaikappan P: Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J* 2008; 49: 640-643.

Riccardi G, Giacco R, Rivellesse AA: Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004; 23: 447-456.

Riedl A, Gieger Ch, Hauner H, et al: Metabotyping and its application in targeted nutrition: an overview.

Rizos E, Tambaki AP, Gazi I, et al: Lipoprotein associated PAF-acylhydrolase activity in subjects with metabolic syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72: 203-209. *British Journal of Nutrition* 2017; 117: 1631-44.

Rizzo M, Berneis K: Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *Q J Med* 2006; 99: 1-14.

Rysz-Górzyńska M, Gluba-Brzózka A, Banach M: High-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions in patients with chronic kidney disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2017; 15: 123-34.

Saito E, Okada T, Abe Y, et al: Abdominal adiposity is associated with fatty acid desaturase activity in boys: implications for C-reactive protein and insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013; 88: 307-11.

Sakai N, Uchida Y, Ohashi K, et al: Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA. *J Lipid Res* 2003; 44: 1256-1262.

Saland JM, Parekh RS: Dyslipidemia in renal disease. In: Kwiterovich PO jr. (ed) *The John Hopkins textbook of dyslipidemia*. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer 2010; 132-42.

Samra ZQ, Pervaiz S, Shaheen S, et al: Determination of oxygen derived free radicals producer (xanthine oxidase) and scavenger (paraoxonase1) enzymes and lipid parameters in different cancer patients. *Clin Lab* 2011; 57: 741-747.

Santini SA, Spada C, Bononi F, et al: Liver, pancreas and biliary tract enhanced lipoperoxidation products in pure pancreatic juice: evidence for organ-specific oxidative stress in chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 888-892.

- Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A: The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* 2015; 7: 9453-74.
- Sato I, Ishikawa Y, Ishimoto A, et al: Significance of measuring serum concentrations of remnant lipoproteins and apolipoprotein B-48 in fasting period. *J Atheroscl Thromb* 2009; 16: 12-20.
- Scaglia N, Igal RA: Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol* 2008; 33: 839-850.
- Shoji T, Nishizawa Y, Kawagishi T, et al: Intermediate-density lipoprotein as an independent risk factor for aortic atherosclerosis in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1277-84.
- Schoenberg MH, Büchler M, Pietrzyk C, et al: Lipid peroxidation and glutathion metabolism in chronic pancreatitis. *Pancreas* 1995; 10: 36-43.
- Schumaker VN, Puppione DL: Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods in Enzymology*. 1986; 128: 155-70.
- Simon JA, Fong J, Bernert JT, et al: Relation of smoking and alcohol consumption to serum fatty acids. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 325-334.
- Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, et al: Prospective study of diet and pancreatic cancer in male smokers. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 783-792.
- Suiter C, Singha SK, Khalili R, Shariat-Madar Z: Free Fatty Acids: Circulating Contributors of Metabolic Syndrome. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2018; 16: 20-34.
- Špičák J: Kyslíkové radikály v patogenezi akutní a chronické pankreatitidy. In: S. Štípek a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada 2000; 159-163.
- Štípek S, a kol: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Avicenum Grada 2000; 334 str.
- Tabur S, Torun AN, Sabuncu T, et al: Non-diabetic metabolic syndrome and obesity do not affect serum paraoxonase and arylesterase activities but do affect oxidative stress and inflammation. *Eur J Endocrinol* 2010; 162: 535-541.

- Thiebaut AC, Jiao L, Silverman DT, et al: Dietary fatty acids and pancreatic cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1001-1011.
- Tosi F, Sartori F, Guarini P, et al: Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. *Adv Exp Med Biol* 2014; 824: 61-81.
- Tvrzická E, Vecka M, Staňková B, et al: Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection Quantitative aspects. *Anal Chim Acta* 2002; 465: 337-350.
- Tvrzická E, Kremmyda LS, Staňková B, Žák A: Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011; 155: 117-130.
- Vareka T, Vecka M, Jirak R, et al: Plasma fatty acid profile in depressive disorder resembles insulin resistance state. *Neuro Endocrinol Lett* 2012;33 Suppl 2:83-6.
- Varlamov O, Bethea CL, Roberts CT Jr: Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 5: 241.
- Vávrová L, Kodydková J, Zeman M, et al: Altered Activities of Antioxidant Enzymes in Patients with Metabolic Syndrome. *Obesity Facts* 2013; 6: 39-47.
- Vecka M: Lipoproteins. 2015; Dostupné z <http://ulbld.lf1.cuni.cz/en/lecture-presentations-and-hand-outs-generalmedicine2r>. [cit. 20.5.2019].
- Vekic J, Zeljkovic A, Bogavac-Stanojevic N: Cox proportional hazard model analysis of survival in end stage renal disease patients with small-sized high-density lipoprotein particles. *Clin Biochem* 2011; 44: 635-41.
- Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, et al: Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16: 1103-1123.
- Wang C, Yu J, Wang H, et al: Lipid Peroxidation and Altered Anti-oxidant Status in Breast Adenocarcinoma Patients. *Drug Res (Stuttg)* 2014; 64: 690-692.
- Warensjö E, Sundström J, Vessby B: Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: A population-based prospective study. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 203–209.

- Warensjö E, Ingelsson E, Lundmark P, et al: Polymorphisms in the SCD1 gene: Associations with body fat distribution and insulin sensitivity. *Obesity* 2007; 15: 1732-40.
- Warensjö E, Sundström J, Vessby B: Factor analysis of fatty acids in serum lipids as a measure of dietary fat quality in relation to the metabolic syndrome in men. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 442-448.
- Warensjö E, Risérus U, Vessby B: Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia* 2005; 48: 1999-2005.
- Wendel M, Heller AR: Anticancer actions of omega-3 fatty acids--current state and future perspectives. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 457-470.
- Wieland H, Seidel D: A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1983; 24: 904-909.
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M: Hyperglycemia potentiates collagen induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001; 50: 1491-1494.
- Yilmaz H, Sayar N, Yilmaz M, et al: Serum paraoxonase 1 activity in women with metabolic syndrome. *Kardiol Pol* 2010; 68: 1219-1224.
- Yokoi K, Shih LC, Kobayashi R, et al: Serum amyloid A as a tumor marker in sera of nude mice with orthotopic human pancreatic cancer and in plasma of patients with pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2005; 27: 1361-1369.
- Yonezawa T, Haga S, Kobayashi Y, et al: Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367: 729-735.
- Zdravotnická ročenka ČR 2017. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky, 2018; dostupné na www.uzis.cz
- Zdravotnická statistika ČR: Novotvary 2016 ČR – Cancer incidence in the Czech Republic, 2016. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2016.
- Zeman M, Vecka M, Burda M, et al: Fatty Acid Composition of Plasma Phosphatidylcholine Determines Body Fat Parameters in Subjects with Metabolic Syndrome-Related Traits. *Metab Syndr Relat Disord* 2017; 15: 371-378.

Zeman M, Macášek J, Burda M, et al: Chronic pancreatitis and the composition of plasma phosphatidylcholine fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016; 108: 38-44.

Zeman M, Žák A, Vecka M, et al: Treatment of hyperglyceridemia with fenofibrate, fatty acid composition of plasma and LDL and their relations to parameters of lipoperoxidation of LDL. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967: 336-341.

Zemanova M, Vecka M, Petruželka L, et al: Plasma Phosphatidylcholines Fatty Acids in Men with Squamous Cell Esophageal Cancer: Chemoradiotherapy Improves Abnormal Profile. *Med Sci Monit* 2016; 30: 4092-4099.

Zhang L, Lin B: Decreased serum paraoxonase activity in patients with chronic pancreatitis. *Am J Med Sci* 2013; 346: 363-365.

Zuijdgeest-van Leeuwen SD, van der Heijden MS, Rietveld T, et al: Fatty acid composition of plasma lipids in patients with pancreatic, lung and oesophageal cancer in comparison with healthy subjects. *Clin Nutr* 2002; 21: 225-230.

Žák A: Oxidační stres a kardiovaskulární onemocnění. In: S. Štípek a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Avicenum Grada 2000; 117-143.

Žák A, Tvrzická E, Vecka M, et al: Severity of metabolic syndrome unfavorably influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. *Tohoku J Exp Med* 2007; 212: 359-371.

Žák A, Jáchymová M, Tvrzická E, et al: The influence of polymorphisms of -493G/T MTP gene promoter and metabolic syndrome on lipids, fatty acids and oxidative stress. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 634-641.

Žák A, Zeman M: Sekundární dyslipidémie (dyslipoproteinémie). In: Svačina Š (Ed.). *Poruchy metabolismu a výživy*. Praha: Galén 2010; 147-176.

Žák A: Poruchy metabolismu lipidů a lipoproteinů. In: T. Zima *Laboratorní diagnostika*. 3. doplněné a přepracované vyd. Praha: Galén 2013; 169-207.

Žák A, Burda M, Vecka M, et al: Fatty acid composition indicates two types of metabolic syndrome independent of clinical and laboratory parameters. *Physiol Res* 2014; 63(Suppl 3): S375-S385.

Žák A, Slabý A, Tvrzická E, et al: Desaturases of fatty acids (FADS) and their physiological and clinical implication. *Cas Lek Cesk* 2016; 155: 15-21.

17. Publikační činnost

17.1. Publikace se vztahem k disertaci

17.1.1. Publikace s IF

- 1) **Staňková B**, Macášek J, Zeman M, Vecka M, Tvrzická E, Jáchymová M, Slabý A, Žák A. Polymorphisms *rs2167444* and *rs508384* in the *SCD1* gene are linked with high apoB-48 levels and adverse profile of cardiometabolic risk factors. *Folia Biologica*, 2019, v tisku. (IF: 1,044; pro rok 2018)
- 2) Dusejovska M, **Stankova B**, Vecka M, Rychlíková J, Mokrejsova M, Rychlík I, Zak A.: *Lipid Metabolism in Patients with End-Stage Renal Disease: A Five Year Follow-up Study*. *Curr Vasc Pharmacol*. 2018; 16(3): 298-305. (IF: 2,087)
- 3) Zeman M, Vecka M, Burda M, Tvrzická E, **Staňková B**, Macášek J, Žák A.: *Fatty Acid Composition of Plasma Phosphatidylcholine Determines Body Fat Parameters in Subjects with Metabolic Syndrome-Related Traits*. *Metab Syndr Relat Disord*. 2017; 15(7): 371-378. (IF: 1,744)
- 4) Zeman M, Macášek J, Burda M, Tvrzická E, Vecka M, Krechler T, **Staňková B**, Hrabák P Jr, Žák A.: *Chronic pancreatitis and the composition of plasma phosphatidylcholine fatty acids*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016; 108:38-44. (IF: 3,085)
- 5) Žák A, Burda M, Vecka M, Zeman M, Tvrzická E, **Staňková B**.: *Fatty acid composition indicates two types of metabolic syndrome independent of clinical and laboratory parameters*. *Physiol Res*. 2014; 63 Suppl 3:S375-85. (IF: 1,293)
- 6) Vávrová L, Kodydková J, Zeman M, Dušejovská M, Macášek J, **Staňková B**, Tvrzická E, Žák A.: *Altered Activities of Antioxidant Enzymes in Patients with Metabolic Syndrome*. *Obesity Facts*. 2013; 6(1):39-47. (IF: 1,705)
- 7) Kodydková J, Vávrová L, **Staňková B**, Macášek J, Krechler T, Žák A.: *Changes in antioxidants and oxidative stress markers in pancreatic diseases*. *Pancreas*. 2013; 42(4):614-21. (IF: 3,008)
- 8) Macášek J, Vecka M, Žák A, Urbánek M, Krechler T, Petruželka L, **Staňková B**, Zeman M.: *Plasma fatty acid composition in patients with pancreatic cancer: correlations to clinical parameters*. *Nutr Cancer*. 2012; 64(7):946-55. (IF: 2,695)

17.1.2. Publikace bez IF

- 1) Vávrová L., **Staňková B.**, Rychlíková J., Žák A.: *Prohloubení oxidačního stresu u karcinomu pankreatu vlivem malnutrice*. Klin. Biochem. Metab. 2018; 26 (47): 126-131.
- 2) **Staňková B.**, Vávrová L., Rychlíková J., Žák A.: *Změny aktivity Paraoxonasy I a koncentrace konjugovaných dienů ve spojení s počtem složek metabolického syndromu*. Klin. Biochem. Metab. 2016; 24 (45): 88-93.
- 3) Žák A, Slabý A, Tvrzická E, Jáchymová M, Macásek J, Vecka M, Zeman M, **Staňková B.**: *Desaturases of fatty acids (FADS) and their physiological and clinical implication*. Cas Lek Cesk. 2016; 155(2):15-21. Review, (In Czech).

17.2. Publikace bez vztahu k disertaci

17.2.1. Publikace s IF

- 1) Pavlisova J, Bardova K, **Stankova B**, Tvrzicka E, Kopecky J, Rossmeisl M: *Corn oil versus lard: Metabolic effects of omega-3 fatty acids in mice fed obesogenic diets with different fatty acid composition*. Biochimie. 2016; 124:150-162. (IF: 3,112)
- 2) Hlavaty P, Tvrzicka E, **Stankova B**, Zamrazilova H, Sedlackova B, Dusatkova L, Hainer V, Kunesova M: *Association of plasma lipids fatty acid composition with metabolic profile of Czech adolescents*. Physiol Res. 2015; 64 Suppl 2:S167-75. (IF: 1,643)
- 3) Kunešová M, Sedláčková B, Bradnová O, Tvrzická E, **Staňková B**, Šrámková P, Doležalová K, Kalousková P, Hlavatý P, Hill M, Bendlová B, Fried M, Hainer V, Vrbíková J: *Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides in obese diabetic women after bariatric surgery: a 2-year follow up*. Physiol Res. 2015; 64 Suppl 2:S155-66. (IF: 1,643)
- 4) Zeman M, Vecka M, Perlík F, Hromádka R, **Staňková B**, Tvrzická E, Žák A: *Niacin in the Treatment of Hyperlipidemias in Light of New Clinical Trials: Has Niacin Lost its Place?* Med Sci Monit. 2015; 21:2156-62. (IF: 1,405)
- 5) Sirc J, Hrib J, Vetric M, Hobzova R, Zak A, **Stankova B**, Slanar O, Hromadka R, Sandrikova V, Michalek J: *The use of a hydrogel matrix for controlled delivery of*

- niacin to the gastrointestinal tract for treatment of hyperlipidemia. Physiol Res. 2015;64 Suppl 1:S51-60. (IF: 1,643)*
- 6) Rossmeisl M, Medrikova D, van Schothorst EM, Pavlisova J, Kuda O, Hensler M, Bardova K, Flachs P, **Stankova B**, Vecka M, Tvrzicka E, Zak A, Keijer J, Kopecky J: *Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. Biochim Biophys Acta. 2014 Feb;1841(2):267-78. (IF: 5,12)*
 - 7) Zemanová M, **Staňková B**, Ušiakova Z, Tvrzická E, Pazdro A, Petruželka L, Zeman M: *Serum adiponectin relates to shortened overall survival in men with squamous cell esophageal cancer treated with preoperative concurrent chemoradiotherapy: a pilot study. Med Sci Monit. 2014; 20:2351-7. (IF: 1,433)*
 - 8) Hoek-van den Hil EF, Keijer J, Bunschoten A, Vervoort JJ, **Stankova B**, Bekkenkamp M, Herreman L, Venema D, Hollman PC, Tvrzicka E, Rietjens IM, van Schothorst EM: *Quercetin induces hepatic lipid omega-oxidation and lowers serum lipid levels in mice. PLoS One. 2013;8(1):e51588. (IF: 3,534)*
 - 9) Vecka M, Dušejovská M, **Staňková B**, Zeman M, Vávrová L, Kodydková J, Slabý A, Žák A: *N-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of atherogenic dyslipidemia. Neuro Endocrinol Lett. 2012;33 Suppl 2:87-92. (IF: 0,932)*
 - 10) Rossmeisl M, Jilkova ZM, Kuda O, Jelenik T, Medrikova D, **Stankova B**, Kristinsson B, Haraldsson GG, Svensen H, Stoknes I, Sjövall P, Magnusson Y, Balvers MG, Verhoeckx KC, Tvrzicka E, Bryhn M, Kopecky J: *Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. PLoS One. 2012;7(6):e38834. (3,730)*
 - 11) Kunešová M, Hlavatý P, Tvrzická E, **Staňková B**, Kalousková P, Viguerie N, Larsen TM, van Baak MA, Jebb SA, Martinez JA, Pfeiffer AF, Kafatos A, Handjieva-Darlenska T, Hill M, Langin D, Zák A, Astrup A, Saris WH: *Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides after weightloss and weight maintenance: the DIOGENES study. Physiol Res. 2012; 61(6):597-607. (IF: 1,531)*
 - 12) Kremmyda LS, Tvrzicka E, **Stankova B**, Zak A: *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155(3):195-218. (IF: 0,702)*

- 13) Tvrzicka E, Kremmyda LS, **Stankova B**, Zak A: *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155(2):117-30. (IF: 0,702)
- 14) Zeman M, Jáchymová M, Jiráček R, Vecka M, Tvrzická E, **Stanková B**, Zák A: *Polymorphisms of genes for brain-derived neurotrophic factor, methylenetetrahydrofolate reductase, tyrosine hydroxylase, and endothelial nitric oxide synthase in depression and metabolic syndrome*. Folia Biol (Praha). 2010; 56(1):19-26. (IF: 0,729)
- 15) Kodydková J, Vávrová L, Zeman M, Jiráček R, Macáček J, **Staňková B**, Tvrzická E, Žák A.: *Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women*. Clin Biochem. 2009; 42(13-14):1368-74. (IF: 2.019)
- 16) Zeman M, Stopka P, Vecka M, Žák A, Písaříková A, Jiráček R, **Staňková B**, Vávrová L, Krizová J, Macáček J: *Electron Spin Resonance Determination of Hydroxyl and Nitroxide Radicals in Depressions and Hyperlipidemia*. Chemické listy, 2009; 103(8):667-671. (IF: 0.717)

18. Seznam příloh

Příloha 1

Macášek J, Vecka M, Žák A, Urbánek M, Krechler T, Petruželka L, **Staňková B**, Zeman M.: Plasma fatty acid composition in patients with pancreatic cancer: correlations to clinical parameters. *Nutr Cancer* 2012; 64(7): 946-955.

Příloha 2

Vávrová L, Kodydková J, Zeman M, Dušejovská M, Macášek J, **Staňková B**, Tvrzická E, Žák A.: Altered Activities of Antioxidant Enzymes in Patients with Metabolic Syndrome. *Obesity Facts* 2013; 6(1): 39-47.

Příloha 3

Kodydková J, Vávrová L, **Staňková B**, Macášek J, Krechler T, Žák A: Changes in antioxidants and oxidative stress markers in pancreatic diseases. *Pancreas* 2013; 42(4): 614-621.

Příloha 4

Žák A, Burda M, Vecka M, Zeman M, Tvrzická E, **Staňková B**.: Fatty acid composition indicates two types of metabolic syndrome independent of clinical and laboratory parameters. *Physiol Res* 2014; 63(Suppl 3): S375-S385.

Příloha 5

Zeman M, Macášek J, Burda M, Tvrzická E, Vecka M, Krechler T, **Staňková B**, Hrabák P Jr, Žák A.: Chronic pancreatitis and the composition of plasma phosphatidylcholine fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016; 108: 38-44.

Příloha 6

Staňková B, Vávrová L, Rychlíková J, Žák A: Změny aktivity Paraoxonasy 1 a koncentrace konjugovaných dienu ve spojení s počtem složek metabolického syndromu. *Klin Biochem Metab* 2016; 24(45): 88-93.

Příloha 7

Zeman M, Vecka M, Burda M, Tvrzická E, **Staňková B**, Macášek J, Žák A.: Fatty Acid Composition of Plasma Phosphatidylcholine Determines Body Fat Parameters in Subjects with Metabolic Syndrome-Related Traits. *Metab Syndr Relat Disord* 2017; 15(7): 371-378.

Příloha 8

Dušejská M, **Staňková B**, Vecka M, Rychlíková J, Mokrejšová M, Rychlík I, Žák A: Lipid Metabolism in Patients with End-Stage Renal Disease: A Five Year Follow-up Study. *Curr Vasc Pharmacol* 2018; 16(3): 298-305.

Příloha 9

Vávrová L, **Staňková B**, Rychlíková J, Žák A: Prohloubení oxidačního stresu u karcinomu pankreatu vlivem malnutrice. *Klin Biochem Metab* 2018; 26 (47): 126-131.

Příloha 10

Staňková B, Macášek J, Zeman M, Vecka M, Tvrzická E, Jáchymová M, Slabý A, Žák A: Polymorphisms *rs2167444* and *rs508384* in the SCD1 gene are linked with high apoB-48 levels and adverse profile of cardiometabolic risk factors. *Folia Biologica*, přijato do tisku.