



Universita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
IV. interní klinika



Význam stanovení necholesterolových sterolů a
profilu mastných kyselin za různých
patofysiologických stavů

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Marek Vecka
Školitel: RNDr. Eva Tvrzická, CSc.
Školitel konsultant: prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc.
IV. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

2007

Poděkování

Tato disertační práce byla vypracována na IV. interní klinice 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze během let 1999-2006. Chtěl bych na tomto místě poděkovat především mé školitelce, RNDr. Evě Tvrzické, CSc., která mi po celou dobu radila a pomáhala v nesnázích, prof. MUDr. Aleši Žákovi, DrSc., přednostovi IV. interní kliniky a mému školiteli konsultantu, za možnost vypracovat disertační práci na klinice a za nesčetné připomínky a rady, pracovníkům Výzkumné angiologické i lipidové laboratoře, hlavně Mgr. Barboře Staňkové, Stanislavě Eichlerové za pomoc při shánění odborné literatury. Poděkování patří také mým blízkým, kteří mě nejvíce ze všech postrádali, podporovali i dodávali sebedůvěru ve věcech těžších, než bylo ze začátku patrné. Všem spoluautorům publikací patří dík za jejich schopnosti proměnit společnou práci na těch zdánlivě jen několik stránek v časopisech, jejichž hodnotu znají jen oni sami.

Bez grantové podpory by asi žádná současná vědecká práce nebyla myslitelná. Studie, které jsou součástí této disertace, vznikly za podpory grantových agentur, konkrétně grantů IGA UK 72/1999, FRVŠ 6-1479, IGA MZd 3596-3, MŠM 113100001, MŠM 113100003, IGA MZd NR/8149-3, GAUK 94 2004 C, výzkumných záměrů J 13/98 1111 0000 2-1 a 0021620820 MŠM ČR a taktéž projektu NUGENOB 5. rámcového projektu Evropské Unie.

Mé rodině

Prohlašuji, že jsem v předložené disertační práci použil pouze pramenů, které cituji a uvádím v seznamech použité literatury.

V Praze, 15. prosince 2006

Mgr. Marek Vecka

OBSAH

1 LITERÁRNÍ ÚVOD	3
1.1 Mastné kyseliny a jejich význam	4
1.1.1 Biosynthesa mastných kyselin	4
1.1.2 Strukturální funkce mastných kyselin	7
1.1.3 Kovalentní reakce mastných kyselin	8
1.1.4 Nekovalentní interakce mastných kyselin	9
1.1.5 Specifické mastné kyseliny	10
1.2 Necholesterolové steroly a jejich význam	12
1.2.1 Prekursory cholesterolu	12
1.2.1.1 Názvosloví a struktura sterolů	12
1.2.1.2 Biosynthetická dráha cholesterolu	13
1.2.1.3 Zdroje prekursorů cholesterolu	13
1.2.1.4 Metabolický význam sloučenin cholesterolové biosynthetické dráhy	14
1.2.1.5 Metabolismus vybraných prekursorů cholesterolu	16
1.2.2 5 α -Cholestanol	20
1.2.3 Fytosteroly a absorpce cholesterolu	21
1.2.3.1 Úloha a biosynthesa fytosterolů v rostlinné buňce	21
1.2.3.2 Absorpce sterolů	23
1.2.3.3 Metabolismus fytosterolů	25
1.2.3.4 Mechanismus účinku fytosterolů	26
1.3 Vztah metabolismu mastných kyselin a sterolů	28
1.4 Mastné kyseliny a necholesterolové steroly v klinické praxi	31
1.4.1 Mastné kyseliny a malnutriční stavy	31
1.4.1.1 Některé patofysiologické stavy a mastné kyseliny	31
1.4.1.2 Terapie mastnými kyselinami	33
1.4.2 Prekursory cholesterolu a jejich patofysiologický význam	36
1.4.2.1 Inhibice biosynthesy cholesterolu	36
1.4.2.2 Změna úrovně biosynthesy cholesterolu	37
1.4.3 Fytosteroly za patofysiologických stavů	41
1.5 Plynová chromatografie mastných kyselin a sterolů	43
1.5.1 Analýsa mastných kyselin	43
1.5.2 Analýsa sterolů	44
Cíl disertace	45
2 MATERIÁL A METODY	46
2.1 Použité chemikálie	46
2.2 Kalibrační standardy	46
2.3 Přístrojové vybavení	47
2.4 Experimentální model	48
2.5 Klinické soubory	48
2.6 Analytické metody	50
2.6.1 Rutinní biochemické analýsy	50
2.6.2 Ultracentrifugační preparace lipoproteinů	50
2.6.3 Extrakce a analýsy mozkových lipidů	51
2.6.4 Chromatografické analýsy	51
2.6.4.1 Analýsy mastných kyselin	51
2.6.4.2 Analýsy necholesterolových sterolů	52
2.6.4.3 Analýsy cholesterolu	53
2.7 Statistické analýsy	53

3 VÝSLEDKY A DISKUSE	54
3.1 Metodické studie	54
3.1.1 Analýza mastných kyselin	55
3.1.1.1 <i>Vliv kolony a software na stanovení mastných kyselin (Studie I)</i>	55
3.1.1.2 <i>Vliv použité analytické matrice na stanovení mastných kyselin (Studie II)</i>	62
3.1.1.3 <i>Porovnání zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech a fosfatidylcholinu sera (Studie III)</i>	69
3.1.2 Analýza sterolů (Studie IV)	72
3.1.2.1 Vliv nástřiku a následné derivatisace	72
3.1.2.2 Současné stanovení celkového cholesterolu společně s necholesterolovými steroly	76
3.1.2.3 Vliv jednotlivých kroků analýzy na chybu stanovení	79
3.2 Experimentální studie	83
3.2.1 <i>Vliv hypolipidemických léků na složení mastných kyselin a obsah lipidových tříd v potkaním mozku (Studie V)</i>	83
3.3 Klinické studie	89
3.3.1 <i>Mastné kyseliny a necholesterolové steroly u mentální anorexie (Studie VI)</i> ...	89
3.3.2 <i>Mastné kyseliny a necholesterolové steroly u proteino-energetické malnutrice (Studie VII)</i>	96
3.3.3 <i>Obsah tuku u nízkoenergetických diet a zastoupení mastných kyselin a necholesterolových sterolů v plasmě (Studie VIII)</i>	101
4 OBECNÁ DISKUSE	109
4.1 Metodické aspekty disertace.....	109
4.2 Experimentální studie	111
4.3 Klinické studie	111
5 ZÁVĚR	116
6 SOUHRN	117
7 SEZNAM LITERATURY	119
8 SEZNAM ZKRATEK	131

Příloha

Publikace autora

1 LITERÁRNÍ ÚVOD

První zmínka o sloučenině podobné cholesterolu se objevila téměř před dvěma sty čtyřiceti lety (Poullétier de la Salle 1769), ovšem za dnešní název vděčíme jinému Francouzi, M. E. Chevreulovi (1815)¹. Od té doby byly objeveny v živých organismech tisíce steroidů, látek se strukturou založenou na steranovém tetracyklickém systému. Velká strukturní rozmanitost steroidů se odráží v širokém rozsahu jejich účinků. Menší skupina steroidů, steroly, je charakterisována hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku. Patří mezi ně hlavně cholesterol s meziprodukty jeho biosynthesy a také steroly obsažené v rostlinách (fytosteroly). Meziprodukty biosynthesy cholesterolu a fytosteroly se někdy v literatuře souhrnně označují jako necholesterolové steroly. Do nedávné doby se mělo za to, že velká skupina meziproduktů biosynthesy cholesterolu nevykazuje žádné klinicky významné vlastnosti a že jejich počet je jen daní za složitou cílovou strukturu molekuly cholesterolu. V poslední době se ale ukazuje, že i některé meziprodukty biosynthesy cholesterolu mají v organismu své funkce.

Mastné kyseliny jsou důležitou součástí lipidů s neméně širokým rozsahem účinku. Uplatňují se jako strukturální součást buněčných membrán, ligandy jaderných faktorů, signální molekuly a prekursory několika typů sloučenin, eikosanoidy počínaje a různými funkčními deriváty konče. Esencialita mastných kyselin se dvěma a více dvojnými vazbami přidává ještě nutriční aspekt do bohaté mosaiky vlivů mastných kyselin na organismus.

Strukturální motiv sterolu a řetězce mastné kyseliny se bezprostředně setkává na několika úrovních metabolismu. Molekuly cholesterolu a mastných kyselin spolu interagují v buněčných membránách a jsou zodpovědné za fyzikální vlastnosti biologických membrán. Cholesterol a mastná kyselina tvoří dohromady molekulu cholesteryl esteru, zásobní formy cholesterolu v intracelulárním prostoru a vnitřní části lipoproteinových částic v extracelulárním prostoru (hlavně plasmě). Dále jsou sterolové struktury i struktury mastných kyselin významnými strukturálními motivy ligandů uplatňujících se v transkripčních mechanismech kontrolujících mnohé z genů, které jsou zapojeny v homeostase lipidového metabolismu. Cílové geny jsou v několika případech regulovány jak cholesterolem, tak mastnými kyselinami. Provázanost metabolismu cholesterolu a mastných kyselin nabízí otázku, jak spolu souvisí metabolismus cholesterolu a mastných kyselin u patofysiologických procesů, u kterých je porušen lipidový metabolismus, zejména u homeostasy cholesterolu a přeměny mastných kyselin.

1.1 MASTNÉ KYSELINY A JEJICH ÚLOHA V ŽIVÉM ORGANISMU

(část textu byla publikována online v článku *E. Tvrzická, A Žák, M. Vecka, B. Staňková: FATTY ACIDS IN HUMAN METABOLISM. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [http://www.eolss.net]*)

Není mnoho sloučenin, které by ve svém názvu obsahovaly tak charakteristický „lipidový“ přídomek, jako jsou mastné kyseliny. Ovšem dlouho používaná definice lipidů jako sloučenin přítomných v biologických matricích, které jsou obecně hydrofobního charakteru a v mnoha případech rozpustné v organických rozpouštědlech, nestačí modernímu rozvoji vědy. Nově navržený klasifikační systém lipidů definuje lipidy jako hydrofobní nebo amfipatické (či amfifilní) molekuly, vzniklé buď karbaniontovou kondensací thioesterů (např. mastné kyseliny) nebo karbokationtovou kondensací isoprenových jednotek (např. steroly)^{2*}. Tato definice je velmi široká a bude nutné ji ještě upřesnit³. Pro strukturu mastné kyseliny je typická přítomnost polární části, karboxylu, a nepolárního řetězce, kde mohou být přítomny dvojné vazby.

Délka řetězce a počet i konfigurace dvojných vazeb jsou parametry, které významně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly mastné kyseliny, a biologické vlastnosti příslušných lipidů a subcelulárních struktur; tato variabilita předurčuje mastné kyseliny k různorodému použití v metabolických dějích. Mastné kyseliny tak mají nezastupitelnou úlohu v živočišném organismu. Jsou hlavní zásobní formou energie, nezbytnou strukturální součástí membrán a pomocí kovalentní vazby modifikují a regulují vlastnosti mnohých proteinů. Jako součásti některých lipidových signálních molekul hrají důležitou roli v metabolických regulačních kaskádách⁴. Pojmenování řetězců mastných kyselin je pomocí systematického názvosloví značně nepřehledné, a tak se v literatuře často dává přednost triviálním názvům ([Tabulka 1.1.1](#)), které mají dlouhou historickou tradici.

1.1.1 Biosynthesa mastných kyselin

V živočišné říši můžeme nalézt stovky různých molekul mastných kyselin, nicméně pouze asi 60 je možné identifikovat v lidských tkáních⁵; stručný přehled s triviálními názvy uvádí [tabulka 1.1.1](#). Proces *de novo* biosynthesy řetězce mastné kyseliny je složitý děj, ve kterém hraje důležitou roli biosynthesa struktury kyseliny palmitové (PA, 16:0). Další modifikace řetězce PA se dějí kombinací elongačních, desaturačních a oxidačních

* Vzhledem k tomu, že tento návrh klasifikačního systému lipidů nepoužívá názvoslovnou předponu *ikosa-* pro dvacetihlíkatý skelet, bude dále v textu používána zavedená předpona *eikosa-* a také termín *eikosanoidy*.

mechanismů^{6,7}, pokud máme na mysli pouze přímé a nesubstituované řetězce mastných kyselin. Savci tak dovedou *de novo* syntetisovat mastné kyseliny s nasycenými (SFA) a některými jedno- (MFA) i vícenenasycenými řetězci (PUFA) (Obrázky 1.1.1 a 1.1.2).

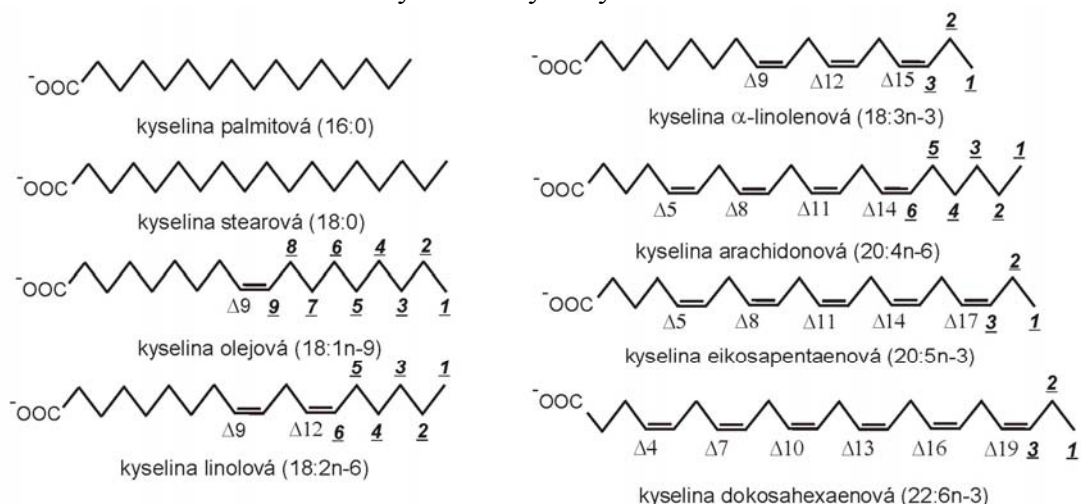
Tab. 1.1.1 Mastné kyseliny

Označení	systematický název podle IUPAC ^a	triviální název	zkratka ^c
10:0	dekanová kyselina	kyselina kaprinová	
12:0	dodekanová kyselina	kyselina laurová	
12:1n-3	<i>cis</i> -dodec-9-enová kyselina	kyselina laurolejšová	
14:0	tetradekanová kyselina	kyselina myristová	MA
14:1n-9	<i>cis</i> -tetradec-5-enová kyselina	kyselina physeterová	
14:1n-5	<i>cis</i> -tetradec-9-enová kyselina	kyselina myristolejšová	MOA
16:0	hexadekanová kyselina	kyselina palmitová	PA
16:1n-9	<i>cis</i> -hexadec-7-enová kyselina		
16:1n-7	<i>cis</i> -hexadec-9-enová kyselina	kyselina palmitolejšová	POA
16:1n-5	<i>cis</i> -hexadec-11-enová kyselina	kyselina palmitvakcenová	(PVA)
17:0	heptadekanová kyselina	kyselina margarová	
18:0	oktadekanová kyselina	kyselina stearová	SA
18:1n-12	<i>cis</i> -oktadec-6-enová kyselina	kyselina petroselinová	
18:1n-9	<i>cis</i> -oktadec-9-enová kyselina	kyselina olejová	OA
18:1n-7	<i>cis</i> -oktadec-11-enová kyselina	kyselina vakcenová, asklepová	VA
18:2n-6	<i>cis,cis</i> -oktadeca-9,12-dienová kyselina	kyselina linolová	LA
18:3n-6	<i>cis,cis,cis</i> -oktadeca-6,9,12-trienová kyselina	kyselina γ -linolenová	GLA
18:3n-3	<i>cis,cis,cis</i> -oktadeca-9,12,15-trienová kyselina	kyselina α -linolenová	ALA
18:4n-3	<i>cis,cis,cis,cis</i> -oktadeca-6,9,12,15-tetraenová kyselina	kyselina stearidonová	(SEA)
20:0	ikosanová kyselina	kyselina arachová	(ARA)
20:1n-11	<i>cis</i> -ikosa-9-enová kyselina	kyselina gondolová	
20:1n-9	<i>cis</i> -ikosa-11-enová kyselina	kyselina gondoová	(GA)
20:1n-7	<i>cis</i> -ikosa-13-enová kyselina	kyselina paullinová	
20:2n-6	<i>cis,cis</i> -ikosa-11,14-dienová kyselina		
20:3n-9	<i>cis,cis,cis</i> -ikosa-5,8,11-trienová kyselina	Meadova kyselina	(MEA)
20:3n-6	<i>cis,cis,cis</i> -ikosa-8,11,14-trienová kyselina	kyselina dihomogamma-linolenová	DHGLA
20:4n-6	<i>cis,cis,cis,cis</i> -ikosa-5,8,11,14-tetraenová kyselina	kyselina arachidová	AA
20:5n-3	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -ikosa-5,8,11,14,17-pentaenová kyselina	(kyselina timnodonová) ^b	EPA
22:0	dokosanová kyselina	kyselina behenová	(BA)
22:1n-11	<i>cis</i> -dokosa-11-enová kyselina	kyselina cetolová	
22:1n-9	<i>cis</i> -dokosa-13-enová kyselina	kyselina eruková	(EA)
22:1n-7	<i>cis</i> -dokosa-15-enová kyselina		
22:4n-6	<i>cis,cis,cis,cis</i> -dokosa-7,10,13,16-tetraenová kyselina	kyselina adrenová	(ADA)
22:5n-3	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -dokosa-7,10,13,16,19-pentaenová kyselina		DPA-3
22:5n-6	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -dokosa-4,7,10,13,16-pentaenová kyselina		DPA-6
22:6n-3	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> -dokosa-4,7,10,13,16,19-hexaenová kyselina	kyselina klupadonová	DHA
24:0	tetrakosanová kyselina	kyselina lignocerová	
24:1n-9	<i>cis</i> -tetrakosa-15-enová kyselina	kyselina nervonová, selacholová	(NA)

^a - použití *E,Z* notace je též možné, ^b - termín timnodonová kyselina náležel původně sloučenině s nejistou strukturou, ^c - zkratky nejsou v soulahu s IUPAC nomenklaturou, ale v odborných textech se často používají.

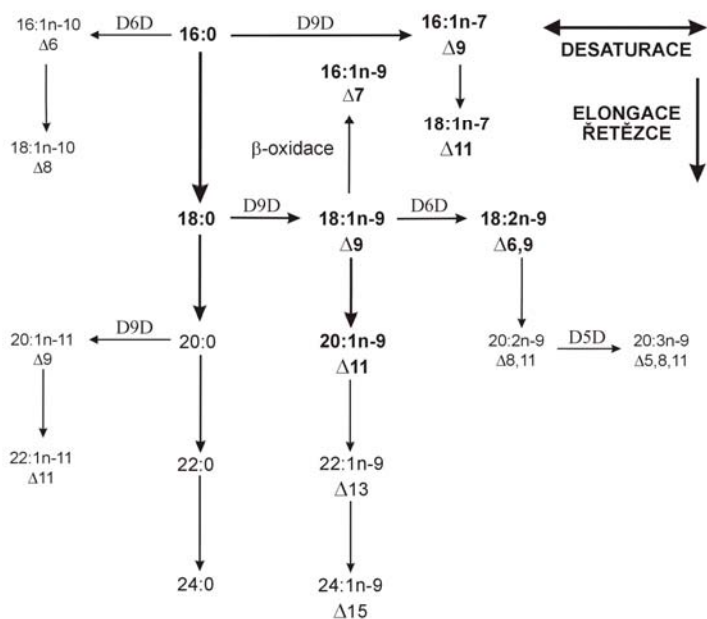
Podle⁸. Označování mastných kyselin viz poznámka ** na str. 6.

Obrázek 1.1.1 Strukturní vzorce některých mastných kyselin



Δn – poloha dvojných vazeb podle IUPAC nomenklatury (od karboxylové skupiny)
 x – číslování uhlíkového řetězce od methylového konce ($n-x$ notace). Podrobněji viz poznámka **.

Obrázek 1.1.2 Metabolické přeměny mastných kyselin nasycených a nenasycených řady n-9



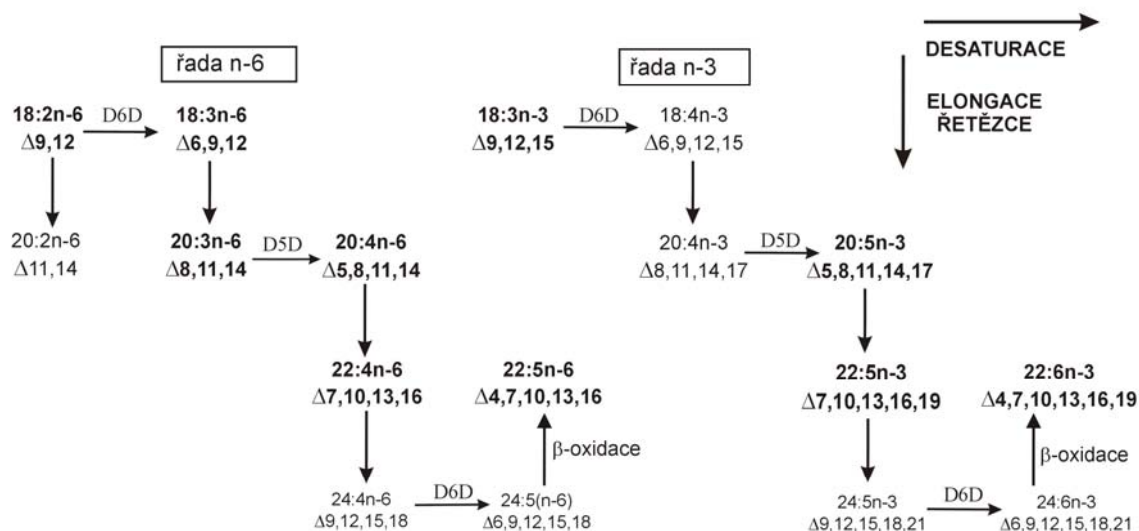
U člověka (savců) jsou exprimovány desaturasy, které působí jak na nasycený řetězec (D9D* a D6D), tak na nenasycený řetězec (D6D a D5D, snad i D8D). Možnost vytvoření dvojných vazeb dále od karboxylové skupiny nám ovšem chybí, a proto v případě kyseliny α -linolenové (ALA, 18:3n-3)** a linolové (LA, 18:2n-6) se musíme zcela spoléhat na jejich dietní přísun,

* desaturasy jsou označeny DnD, kde n je pozice uhlíku od karboxylového konce s nově vytvářenou dvojnou vazbou

** zkrácená notace struktury mastných kyselin bude používána ve tvaru C:Pn-x, kde C je počet uhlíků v řetězci, P počet dvojných vazeb, x pozice první dvojných vazeb počítáno od methylového konce. Tato notace předpokládá, že všechny dvojných vazeb mají konfiguraci cis (Z), jsou od sebe odděleny methylenovou skupinou a na řetězci molekuly nejsou přítomny substituenty (viz Obrázek 1.1.1).

tyto dvě mastné kyseliny jsou pro člověka esenciální (EFA). Další přeměny EFA jsou už u savců možné (Obrázek 1.1.3), i když množství produktů, které jsou takto vytvořeny, pokrývá požadavky organismu nedostatečně, a tyto produkty jsou tedy v závislosti na jejich dietním příjmu esenciální, nebo podmíněně esenciální. Protože jak EFA, tak jejich metabolity obsahují více dvojných vazeb, v dalším textu budou souhrnně označovány PUFA, popřípadě PUFA n-3 nebo PUFA n-6; jediný významný člen PUFA n-9, Meadova kyselina (20:3n-9), bude v textu uváděn zvlášť*.

Obrázek 1.1.3 Metabolické přeměny esenciálních mastných kyselin



1.1.2 Strukturální funkce mastných kyselin

Triacylglyceroly (TAG) slouží v buňce jako hlavní zásobní forma energie, která nevyžaduje přítomnost většího množství vody. Kromě toho se v molekule TAG mohou vázat i EFA (a také PUFA n-3 i n-6), a tak je má organismus k dispozici pro další přeměny. Dále je hydrofobní prostředí TAG fáze důležité pro přenos i deponování důležitých lipofilních molekul (mj. vitaminů A, D, E a K) a v neposlední řadě mají tukové obaly v tkáňovém měřítku význam pro tepelnou izolaci od okolí.

Velmi dlouhé řetězce mastných kyselin se uplatňují ve strukturách ceramidů, které snižují permeabilitu kůže pro vodu a předcházejí tak jejím ztrátám⁹. Řetězce mastných kyselin

* označování jednotlivých řad PUFA je podle pozice první dvojně vazby počítáno od methylového konce v systému dvojných vazeb. PUFA n-9 jsou PUFA s první dvojnou vazbu na 9. uhlíku počítáno od methylového konce a tedy mohou vzniknout v savčím organismu *de novo*, kdežto PUFA n-3 a n-6 vznikají z ALA, resp. z LA, tedy jsou podmíněně esenciální. Přesně vzato, u savců existuje možnost biosynthesy LA a ALA z šestnáctiuhlíkatých prekursorů 16:2n-6 a 16:3n-3, která je ale klinicky nevýznamná¹⁰. Viz též kapitola 1.5.1.1.

přítomné v molekulách lipidových tříd přítomných ve struktuře biologických membrán ovlivňují jejich *fluiditu*. Rafty, funkční membránové domény, obsahují ve zvýšené míře proteiny asociované se sfingolipidy a cholesterolem. V nervové tkáni a retině hraje životně důležitou roli zvýšený obsah kyseliny dokosaheptaenové (DHA, 22:6n-3). Jedinečné vlastnosti této mastné kyseliny hrají ne zcela jasnou úlohu v mechanismu přenosu signálu, snad při regulaci G-proteinové signalisace¹¹.

1.1.3 Kovalentní interakce mastných kyselin

Kovalentní vazba mastné kyseliny s jinými molekulami

Acylace proteinů je důležitým způsobem kovalentní modifikace proteinů¹², které tak získávají přechodně nebo trvale možnost asociovat s biologickými membránami; tak se zvyšuje jejich strukturální stabilita i četnost interakcí protein/protein nebo katalytická aktivita.

Amidové deriváty mastných kyselin (kanabinoidy) upoutaly pozornost už v 50. letech minulého století, kdy se ukázalo, že N-palmitoylethanolamin je protizánětlivý faktor obsažený v sóje i vaječném žloutku¹³. Jako amin vstupující do reakce se uplatňuje ethanolamin, samotný amoniak, nebo některé bioaktivní aminy¹⁴. Výsledné amidy interagují s kanabinoidními receptory (CB) i vaniloidními receptory. Spojení kanabinoidů s lipidovým metabolismem ilustruje fakt, že např. oleoylethanolamid stimuluje lipolysu aktivací subtypu jaderných transkripčních faktorů, α -typu receptorů aktivovaných peroxisomálními proliferátory (PPAR, peroxisome proliferator activated receptor)¹⁵. Synthetický blokátor CB₁, rimonabant (vyvinut v roce 1994), už byl úspěšně vyzkoušen u abdominální obesity a u kuřáků¹⁶.

Ethylestery mastných kyselin, produkty neoxidativního metabolismu ethanolu, jsou v organismu tvořeny syntasou ethylesterů mastných kyselin, která je indukována chronickým užíváním ethanolu. Mohou být snad ligandy PPAR¹⁷, transkripčního faktoru κ B a aktivátorového proteinu 1¹⁸.

Tvorbou lipidů z mastných kyselin vznikají cholesteryl estery, fosfolipidy (glyko- i sfingo-) a další, jejichž vlastnosti budou podle potřeby zmíněny v příslušných kapitolách.

Enzymatická oxidace mastných kyselin

Tvorba eikosanoidů z kyseliny arachidonové (AA, 20:4n-6) zahrnuje velký počet sloučenin s řadou autokrinních i parakrinních účinků¹⁹. Arachidonová kyselina je uvolňována pomocí fosfolipasy A₂ z molekuly fosfolipidu a podstupuje enzymatickou transformaci. Jako substrátu může být použito i jiných kyselin s dvacetihlíkatým řetězcem - kyseliny dihomo- γ -

linolenové (20:3n-6) nebo kyseliny eikosapentaenové (EPA, 20:5n-3)²⁰. Výsledné produkty tvoří eikosanoidy dalších serií. U lipoxygenačních reakcí se jako substráty využívají i LA, kyselina eikosadienová (20:2n-6) a Meadova kyselina (20:3n-9). Ze zástupců *dokosanoidů* tvořených z DHA lze např. uvést neuroprotektin D1, který chrání buňky retiny před oxidačním stresem²¹. Eikosanoidy vzniklé enzymatickými přeměnami mají široký rozsah účinku, z nově identifikovaných efektů má pro nutriční praxi význam 15-lipoxygenasový metabolit AA, 15S-hydroxyeikosatetraenová kyselina. Tato hydroxykyselina ovlivňuje ubikvitinaci proteinů a následnou degradaci v proteasomech za kachektických stavů²² a její produkce je účinně inhibována EPA²³.

Neenzymatická oxidace mastných kyselin

Spontánní reakce řetězce mastné kyseliny s molekulárním kyslíkem (reaktivními formami kyslíku) jsou studovány kvůli možnému zapojení vzniklých sloučenin do destruktivních biologických procesů. Autooxidačními procesy vzniká z molekuly mastné kyseliny mnoho typů sloučenin, například hydroperoxydy, u kyselin s více dvojnými vazbami mohou vznikat i cyklické produkty²⁴. Tyto sloučeniny nejsou stálé a přes stadia hydroxyderivátů, z nichž některé jsou stanovovány jako markery oxidačního stresu, tvoří stálejší sloučeniny s karbonylovou skupinou.

Produkty neenzymatické oxidace AA (*F₂-isoprostany*) se v poslední době dostávají do popředí zájmu jako specifické markery oxidačního stresu²⁵. Jiné cyklické produkty mohou být tvořeny z ALA, EPA (*F₃-isoprostany*) a DHA (tzv. *F₄-neuroprostany*)²⁶. Byla též prokázána tvorba necyklických struktur, nazvaných isoketaly²⁷.

1.1.4 Nekovalentní interakce mastných kyselin

Mastné kyseliny jako ligandy jaderných transkripčních faktorů

Mastné kyseliny byly v posledních letech identifikovány jako účinné ligandy jaderných receptorů PPAR α,β,γ ²⁸, jaderního receptoru X (LXR) α,β ²⁹, jaderního jaderného faktoru (HNF) 4 α ³⁰, retinoidního receptoru X (RXR) α ³¹, farnesoidního receptoru X (FXR)³² a snad i inhibičních faktorů I κ B α,β ³³. Většinou jsou ligandy PUFA řady n-3 i n-6, u modulace inhibičního proteinu I κ B se snad uplatňují krátké SFA.

V hepatocytu jsou PUFA účinnými inhibitory glykolysy a *de novo* lipogenese, protože inhibují expresi genů pro L-pyruvát kinasu, synthasu mastných kyselin i acetyl-CoA karboxylasu. Mastné kyseliny jsou tak směřovány přednostně do oxidačního metabolismu³⁴ a tím klesá i tvorba VLDL částic a hladina TAG v plasmě. Antilipogenní účinek je možné

vysvětlit tím, že PUFA a také některé isomery kyseliny linolové s konjugovaným systémem dvojných vazeb (CLA) modulují v jaterní tkáni obsah mRNA kódující SREBP-1c (vazebný protein sterolového regulačního elementu, sterol responsive element binding protein) nebo přímo jeho transkripci; SREBP-1c je transkripční protein několika lipogenních enzymů³⁵. Obdobný vliv PUFA v tukové tkáni nebyl pozorován.

Mastné kyseliny jako ligandy ostatních receptorů

Receptor pro *faktor aktivující destičky* (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycerol-3-fosfocholin) rozpoznává s vysokou specifitou molekulu PAF, která obsahuje zbytek krátké mastné kyseliny, etherovou vazbu a fosfocholin³⁶.

Interakce mastných kyselin a nukleových kyselin

Tyto interakce jsou předmětem studií prováděných v posledních letech, doposud jsou prozkoumány jen málo. Kyselina linolová a některé další mastné kyseliny inhibují α - i β -DNA polymerasy³⁷. Telomerasa je inhibována MFA, které nasedají do kapsy v aktivním místě enzymu³⁸.

Nereceptorové interakce mastných kyselin a proteinů

Některé mastné kyseliny, jako olejová (OA, 18:1n-9), palmitolejová (POA, 16:1n-7) a AA jsou účinnými odpřahovači buněčné komunikace na úrovni *gap junctions* (mezerových spojů). Navržený mechanismus účinku spočívá ve změně interakcí mezi lipidy a konektivními proteiny buněk, hlavně myocytů³⁹.

Iontové kanály mohou být ovlivňovány mastnými kyselinami - kalciové kanály myocytů srdečních komor jsou přímo aktivovány nenasycenými mastnými kyselinami s delším řetězcem⁴⁰, působení DHA na vznik draslíkového pomalého rektifikačního proudu (*IKs*) je způsobeno vlivem na hminK podjednotku draslíkového kanálu⁴¹. Dále sodíkové kanály vykazují rozdíly mezi srdečními a svalovými isoformami, co se týče typu mastné kyseliny inhibující tento kanál⁴². Antiarytmické účinky PUFA řady n-3 jsou pravděpodobně způsobeny právě těmito interakcemi⁴³.

1.1.5 Specifické mastné kyseliny

Trans isomery mastných kyselin

Trans-isomery mastných kyselin (TFA) jsou ve stravě zastoupeny jako produkty mikrobiálního metabolismu (přes potravní řetězec obsaženy v mléce a odvozených výrobcích, mase býložravců apod.) nebo isomerisace během částečné hydrogenace tuků (používaných hlavně v pečivu a „fast food“ potravinách). Mastné kyseliny s dvojnými vazbami v orientaci *trans* byly v několika studiích spojeny se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních

onemocnění^{44,45}, zřejmě díky zvyšování hladin LDL-C (event. poklesu HDL-C a vzestupu Lp(a)⁴⁶. Přesné vymezení efektu *trans* isomerů mastných kyselin ovšem naráží na metodické obtíže, zvláště na oddělení vlivu SFA, majících podobné účinky a přítomných v analysovaných matricích ve velkém nadbytku⁴⁷.

Velmi dlouhé mononenasyčené mastné kyseliny

Olej z nešlechtěných odrůd řepky olejky obsahuje 20-60 % kyseliny erukové (22:1n-9). Přítomnost této kyseliny v experimentálních dietách vedla u potkanů k ukládání tuků (steatose kardiomyocytů) v srdečním svalu a nakonec k lesím myokardu⁴⁸. Ačkoli nic není známo o takovém účinku erukové kyseliny na člověka, není tato kyselina v lidské stravě považována za žádoucí⁴⁹. Prokazatelný je negativní účinek na počet krevních destiček, který je reversibilní⁵⁰. Krevní destičky za těchto podmínek vykazují membránovou anisotropii a zvýšený obsah kyseliny erukové⁵¹. U pacientů s poruchou biogeneze peroxisomů (např. adrenoleukodystrofií), kteří mají zvýšené plasmatické hladiny SFA s velmi dlouhým řetězcem, se používala směs 1,2,3-trioleoylglycerolu a 1,2,3-trierukoylglycerolu ("Lorenzo's oil") (4:1 (v/v), která tyto hladiny normalisovala. Vedlejší účinky zahrnovaly např. mírné zvýšení aktivit jaterních enzymů (55 %), trombocytopenii (55 %), gastrointestinální potíže (14 %). Často se vyskytovalo i mírné snížení koncentrace hemoglobinu a počtu leukocytů⁵².

Konjugované mastné kyseliny

Mezi nejčastěji zastoupené kyseliny s konjugovaným systémem dvojných vazeb patří CLA s dvojnými vazbami nejčastěji v konfiguracích 9Z,11E (kyselina rumenová), méně 10E,12Z apod. Původ je obdobný jako u *trans* isomerů mastných kyselin, ale biologické účinky byly na rozdíl od *trans* isomerů popisovány jako příznivé. Díky konjugovanému systému dvojných vazeb tyto kyseliny nejsou substráty cyklooxygenas, ale zřejmě kompetují o vazbu na obě formy enzymu a tak snižují např. dostupnost AA a následnou produkci eikosanoidů⁵³. Vazba na PPAR γ byla pro CLA nebo jejich metabolity též prokázána⁵⁴. Tyto kyseliny vykazují *in vitro* antioxidační aktivitu⁵⁵ a antikancerogenní účinky⁵⁶. Protože některé studie příznivé účinky CLA nepotvrdily^{57,58} a také není zcela jasné, do jakých oblastí metabolismu CLA mohou ještě zasahovat, zařazování CLA do dietních doplňků zatím nemá racionální podklad. Tím spíše, že účinky jednotlivých isomerů se od sebe velmi liší a pro nutriční praxi je velmi obtížné udržet obsah jednotlivých isomerů na požadované úrovni. Struktury podobné CLA se u hmyzu využívají jako feromony působící pravděpodobně receptorovým mechanismem⁵⁹, úvahy o analogickém mechanismu u obratlovců se již v literatuře také objevily⁶⁰.

1.2 NECHOLESTEROLOVÉ STEROLY A JEJICH VÝZNAM

1.2.1 PREKURSORY CHOLESTEROLU

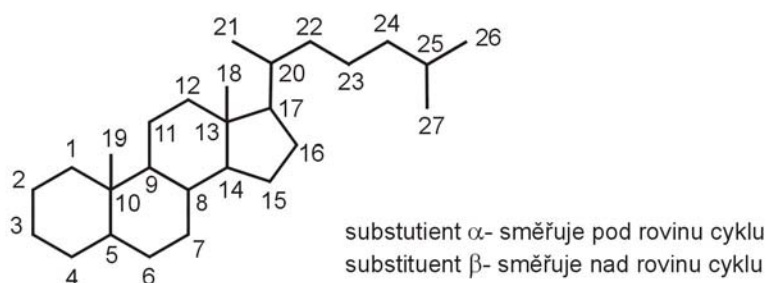
(část textu byla publikována online v článku *M. Vecka, A Žák, E. Tvrzická: STEROLS, ESPECIALLY CHOLESTEROL AND PHYTOSTEROLS, IN HUMAN METABOLISM. Encyclopedia of Life Support Systems(EOLSS), UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [http://www.eolss.net]*)

Steroly patří mezi důležité složky metabolických přeměn a strukturálních motivů eukaryotních buněk. Rostliny a obratlovci používají k syntese sterolů acetyl-CoA. Tyto reakce vykazují pozoruhodnou míru konservativnosti u všech eukaryot, jednobuněčnými kvasinkami počínaje a obratlovci konče. Objasnění celého sledu reakcí biosynthetické dráhy cholesterolu patří mezi velké úspěchy moderní vědy⁶¹. Pozoruhodnou vlastností všech sterolů je odolnost tetracyklického systému vůči enzymatickým aktivitám, přičemž jediným případem, kdy dochází k rozrušení vazeb cyklů, je fotolytické štěpení kruhu B při syntese vitamínu D₃. Všechny ostatní přeměny ponechávají základní skelet čtyř cyklů nedotčený. Výsledné sloučeniny využívají organismy jako stavební součásti membrán (cholesterol), signální molekuly a modulátory aktivit jiných signálních molekul (viz dále), žlučové kyseliny nebo hormony. Není tedy překvapivé, že obratlovci mají pro udržení homeostasy cholesterolu vyvinut systém integrující jeho syntesu, vychytávání, zpětný transport a vnitrobuněčné ukládání⁶².

1.2.1.1 Názvosloví a struktura sterolů

Vlastní definice sterolové molekuly se opírá o definici sterolů jako steroidních molekul s hydroxylovou skupinou na posici 3 β a většinou uhlíkatého skeletu cholestanu. Steroid je chápán jako sloučenina se skeletem cyklopenta[*a*]fenanthrenu nebo odvozená od tohoto skeletu pomocí jednoho nebo více štěpení cyklů, popřípadě rozvinutí nebo kontrakce těchto cyklů⁶³.

Obrázek 1.2.1.1 Číslování skeletu sterolové molekuly



Podobně jako u mastných kyselin se v praxi vžilo spíše názvosloví triviální než systematické, i IUPAC nomenklatura odvozuje názvoslovný skelet podle nesystematicky tvořeného základu pro mateřský uhlovodík, např. pro 27 uhlíkatý uhlovodík je vyhrazen

název cholestan. Číslování uhlíkových atomů na skeletu mateřského uhlovodíku je dáno závazně a je vyznačeno na obrázku 1.2.1.1. Stejně jako v případě mastných kyselin je často dáována přednost triviálním názvům před systematickými (Tabulka 1.2.1.1).

Tabulka 1.2.1.1 Přehled nejčastěji se vyskytujících sterolů

Systematický název podle IUPAC ^a	Triviální název	obrázek
4,4,14 α -trimethyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β -ol	24-dihydrolanosterol	1.2.1.3
cholesta-5,7-dien-3 β -ol	7-dehydrocholesterol, provitamin D ₃	1.2.1.3
(24 <i>S</i>)-24-methyl-cholesta-5,22-dien-3 β -ol	brassikasterol	1.2.3.1
(24 <i>R</i>)-24-methyl-cholest-5-en-3 β -ol	crinosterol	1.2.3.1
4,4,14 α -trimethyl-9,19-cyklo-5 α -cholest-24-en-3 β -ol	cykloartanol, cykloartenol	1.2.3.1
cholesta-5,24-dien-3 β -ol	desmosterol, 24-dehydrocholesterol	1.2.1.3
5 β -cholestan-3 α -ol	epikoprostanol	
(22 <i>E</i>)-(24 <i>S</i>)-24-methyl-cholesta-5,7,22-trien-3 β -ol	ergosterol, provitamin D ₂ , mykosterol	
cholest-5-en-3 β -ol	cholesterol	1.2.1.3
(24 <i>R</i>)-24-methyl-cholest-5-en-3 β -ol	kampesterol	1.2.3.1
4,4,14 α -trimethyl-5 α -cholesta-8,24-dien-3 β -ol	lanosterol	1.2.1.3
5 α -cholest-7-en-3 β -ol	lathosterol, Δ^7 -lathosterol	1.2.1.3
(24 <i>R</i>)-24-ethyl-cholesta-5,22-dien-3 β -ol	stigmasterol	1.2.3.1
5 α -cholesta-8,24-dien-3 β -ol	zymosterol	1.2.1.3
5 α -cholest-8-en-3 β -ol	zymostenol, cholestenol, Δ^8 -lathosterol	1.2.1.3
(24 <i>R</i>)-24-ethyl-cholest-5-en-3 β -ol	β -sitosterol, cinchol, nimbosterol	1.2.3.1
(24 <i>Z</i>)-cholest-5-en-24-ethyliden-3 β -ol	Δ^5 -avenasterol, isofukosterol	1.2.3.1

^a - pro přehlednost byl zvolen u všech sloučenin název odvozený od cholestanu jako mateřského uhlovodíku. Přednost byla dána nenasyceným sloučeninám. Podle⁶⁴.

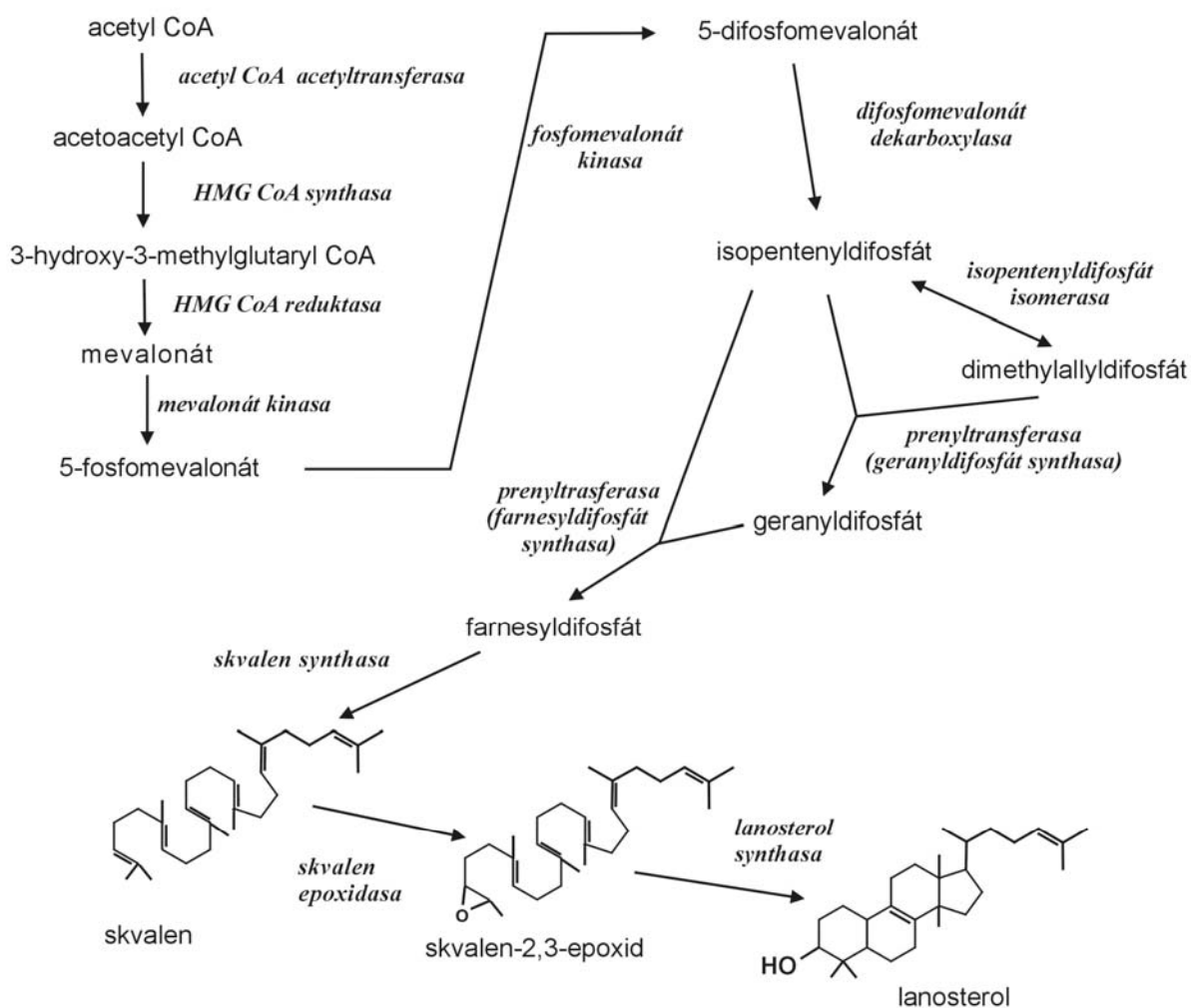
1.2.1.2 Biosynthetická dráha cholesterolu

Stručný přehled reakcí s příslušnými enzymy uvádějí obrázky 1.2.1.2 a 1.2.1.3. Cholesterol je syntetisován z acetyl-CoA mnoha reakcemi probíhajícími v cytoplasmě, endoplasmatickém retikulu a peroxisomech⁶⁵.

1.2.1.3 Zdroje prekursorů cholesterolu

Biosynthetická dráha cholesterolu je lokalizována mimo cytoplasmu a peroxisomy⁶⁶ především na cytoplasmatické straně endoplasmatického retikula, odkud se mohou intermediární metabolity dostávat do plasmatické membrány např. přes kontakty těchto dvou membrán⁶⁷. U kultur fibroblastů byla pozorována v plasmatické membráně přítomnost zymosterolu⁶⁸, lanosterolu a 7-dehydrocholesterolu⁶⁹. Většinou se intermediáty recyklují zpět⁷⁰, ale v případě desmosterolu a lathosterolu se objevují ve větších množstvích v plasmatickém poolu. Desmosterol je do akceptorových lipoproteinových částic inkorporován 2-3x lépe než cholesterol⁷¹, přestup lathosterolu i zymosterolu do sera byl také prokázán⁶⁷.

Obrázek 1.2.1.2 Tvorba lanosterolu



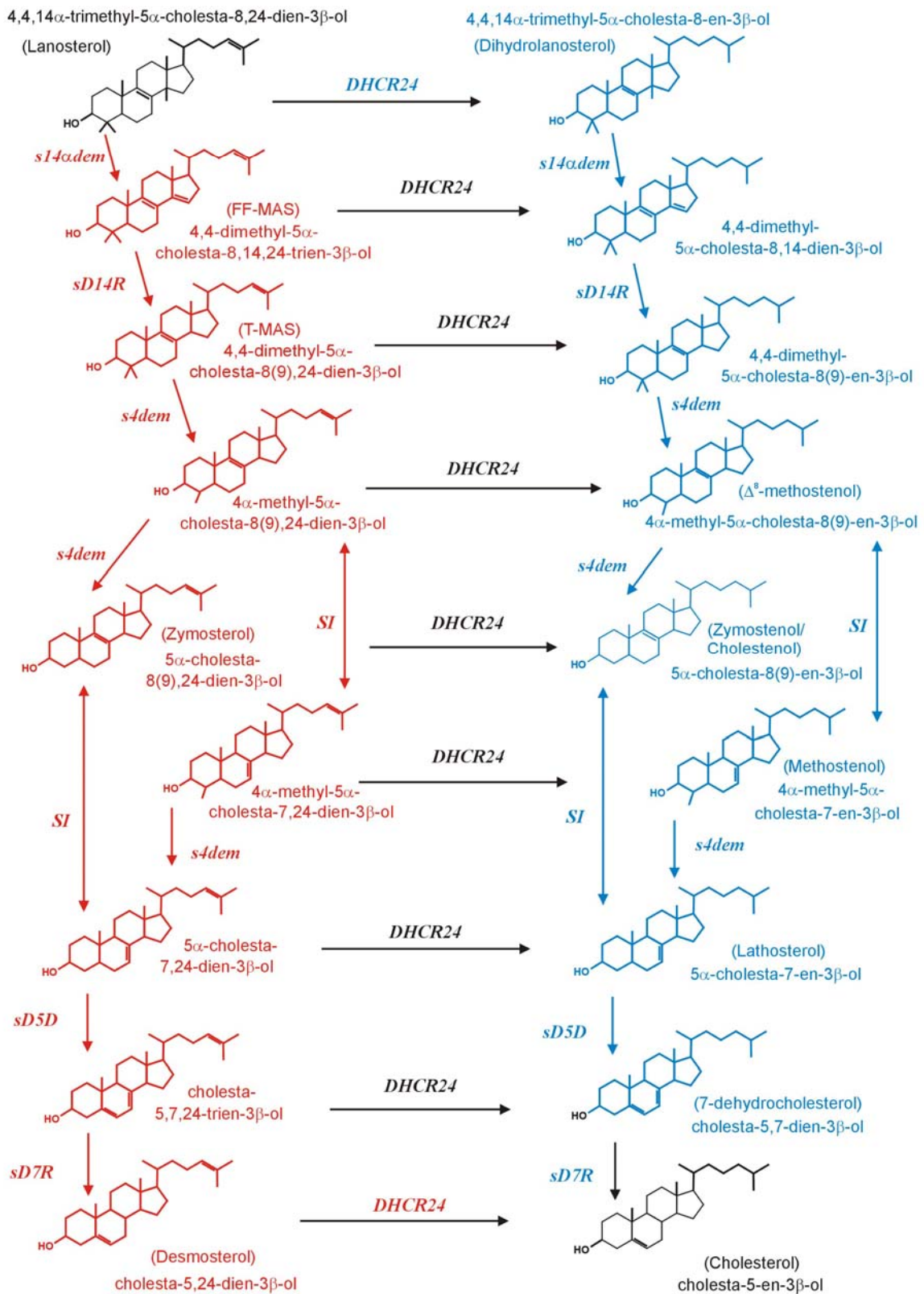
V případě skvalenu i skvalen-2,3-epoxidu je naznačena konformace připomínající strukturu molekuly lanosterolu.

Dietní přísun: Rostliny obecně cholesterol ani jeho prekursorů neobsahují ve větších množstvích, ale jsou druhy, u kterých je obsah lanosterolu vyšší než 2 % všech sterolů – špenát (*Spinacia oleracea L.*) obsahuje asi 3 %, merlík bílý (*Chenopodium album L.*) asi 12 %⁷² lanosterolu. Možné dietní zdroje prekursorů cholesterolu zahrnují samozřejmě živočišné produkty – vajíčka⁷³ nebo i ovčí mléko⁷⁴ s obsahem cca 1 mg lanosterolu/100 mg cholesterolu.

1.2.1.4 Metabolický význam sloučenin cholesterolové biosynthetické dráhy

Protože některé prekursorů cholesterolu jsou využívány pro tvorbu dalších látek (7-dehydrocholesterol) nebo jsou zapojeny do parakrinní signalisace (meiosu aktivující steroly), je možné, že intracelulární mechanismy pro transport prekursorů cholesterolu jsou jiné než pro vlastní cholesterol⁶⁷ a je také jasné, že pro biosynthesu molekuly cholesterolu z lanosterolu nelze použít jediný multienzymatický komplex.

Obrázek 1.2.1.3 Tvorba cholesterolu z lanosterolu



SI - sterol isomerasa, DHCR24 - steroidní D24 reduktasa, s4dem - steroidní 4 demethylasa (obsahuje tři enzymatické aktivity: methyloxidační, dehydrogenační a ketoreduktasovou), sD5D - steroidní D5 desaturasa, s14 α dem - steroidní 14 α demethylasa, sD14R - steroidní D14 reduktasa, sD7R - steroidní D7 reduktasa; Pro zjednodušení není naznačena prostorová konfigurace vazeb. Upraveno podle⁷⁵. Desmosterolová dráha je naznačena červeně, lathosterolová dráha modrou barvou.

Cholesterol je tvořen z lanosterolu pomocí aktivit devíti různých enzymů, z nichž pouze u jediného enzymu, steroidní D7 reductasy (EC 1.3.1.21), bylo prokázáno, že obsahuje ve svém promotoru sekvenci SRE (sekvence sterolového regulačního elementu) a tedy tento enzym je pod kontrolou SREBP, buněčného sensoru hladin cholesterolu⁷⁶.

Sloučeniny následující v biosynthetické dráze lanosterolu byly dlouhou dobu pokládány pouze za meziprodukty. V posledních letech se ale ukazuje, že meziprodukty distální části biosynthetické dráhy cholesterolu jsou subjekty složité regulace na úrovni substrát-produkt i kompartmentové úrovni a že tato dráha plní mnoho funkcí, které mohou být tkáňově specifické (Obrázek 1.2.1.4). Funkci signálních molekul zde nesou meiosis aktivující steroly (MAS) a též cholesterol. Ovlivňované procesy zasahují do transkripčních i posttranskripčních procesů regulace určitých genů⁷⁷, synthesy lipidů, meiosis, apoptosy, signalisace pomocí morfogenních proteinů a degradace proteinů⁷⁸.

Některé prekursory cholesterolu byly prokázány v *membránových raftech*, membránových subdoménách bohatých na cholesterol a sfingolipidy. Nově syntetisovaný lathosterol je inkorporován do membránových raftů rychleji než cholesterol⁶⁷ a tyto membránové domény jsou stabilnější vůči teplu a detergentům než v případě cholesterolu⁷⁹.

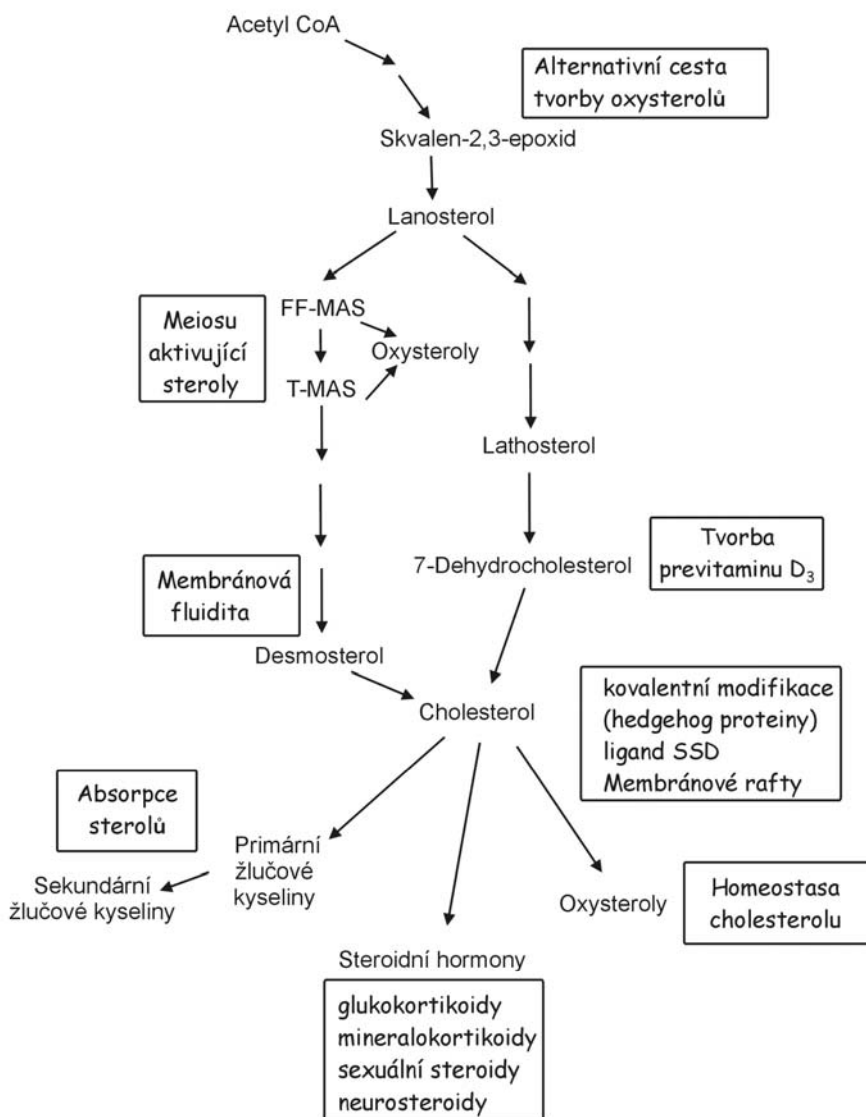
Přímá interakce molekuly proteinu s molekulou sterolu je mechanismem, který se uplatňuje u proteinů s tzv. doménou citlivou na steroly (SSD, sterol sensing domain). Přesný mechanismus této interakce dosud není znám, ale v případě proteinů SCAP a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductasy, jejich SSD doména interaguje pomocí proteinů Insig a tyto dva proteiny zřejmě o vazbu na Insig kompetují⁸⁰. Prekursor cholesterolu desmosterol i fytosterol β -sitosterol působí jako kompetitivní inhibitory interakce cholesterolu s SSD doménou aktivačního proteinu pro štěpení SREBP (SCAP)⁸¹. Další dosud známé proteiny s SSD doménou jsou Niemann-Pick protein C1 (NPC-1), Niemann-Pick protein C1-like 1 (NPC1L1), Patched receptor, protein Dispatched a steroidní D7 reductasa (sD7R). Všechny zmíněné proteiny jsou zapojeny do metabolismu cholesterolu na různých úrovních⁸².

1.2.1.5 Metabolismus vybraných prekursorů cholesterolu

Koncentrace prekursorů cholesterolu v plasmě do jisté míry odráží úroveň biosynthesy cholesterolu. Jejich stanovení je proto rychlá a elegantní alternativa jiných přístupů. Z využívaných meziproduktů stojí za zmínku stanovování hladin kyseliny mevalonové⁸³, skvalenu⁸⁴, lathosterolu⁸⁵ a methyl sterolů⁸⁴ ve fyziologických tekutinách. Stanovení každého z těchto meziproduktů má ale jisté metodické nedostatky: mevalonát je prekursor látek, které organismus využívá jinak než pro biosynthesu cholesterolu; lathosterol v přesném smyslu

slova nereflektuje jen biosynthesu, protože může vstupovat do metabolického obratu sterolů (lipoproteinů) přes možnou esterifikaci pomocí LCAT; methylsteroly a skvalen sice nepodstupují esterifikaci pomocí LCAT, ale jejich koncentrace v plasmě je nízká⁸⁶.

Obrázek 1.2.1.4 Význam biosynthetické dráhy cholesterolu



SSD – doména citlivá na sterol, FF-MAS – folikulární meiosu stimulující sterol, T-MAS – testikulární meiosu stimulující sterol

Lathosterol

Hladiny lathosterolu

Plasmatické hladiny lathosterolu dosahují v období dospívání hodnot kolem 4 $\mu\text{mol/l}$ u chlapců i dívek a s přibývajícím věkem se hodnoty zvyšují; okolo 45 let mají muži okolo 7,5 $\mu\text{mol/l}$, ženy 6 $\mu\text{mol/l}$ ⁸⁷, o deset let později jsou hodnoty u mužů stejné, u žen se zvýší na 6,5 $\mu\text{mol/l}$ ⁸⁸ působením pozitivní korelace syntézy cholesterolu s tělesnou hmotností⁸⁹.

Poměr koncentrací lathosterol/cholesterol je u částic VLDL, IDL, HDL i LDL stejný, tedy nejvíce lathosterolu je neseno v částicích LDL analogicky jako cholesterolu⁹⁰. Infuze částic apolipoproteinu (apo) A-I s fosfatidylcholinem (PC) zvyšuje koncentraci pre-β-HDL částic v krevním oběhu, snižuje tak dostupnost neesterifikovaného cholesterolu v tkáních a následně stimuluje jeho syntesu, což se odrazí ve zvýšené hladině lathosterolu v krvi⁹¹.

Poměr koncentrací prekursorů cholesterolu a cholesterolu ve žluči je v soulase se zvýšenou exkrecí prekursorů cholesterolu (podpora jejich eliminace z organismu) až o řád vyšší než v plasmě⁹².

Při normálním těhotenství jsou zvýšené hladiny cholesterolu spjaty s dvojnásobným zvýšením podílů skvalenu, desmosterolu a lathosterolu. Během laktace zůstává zvýšena hladina desmosterolu. Hladina cholestanolu je během těhotenství zvýšena, laktací se vyrovná. Cholestatická těhotenství mají podobné trendy v hladinách sterolů s obecně nižšími zvýšeními prekursorů cholesterolu⁹³.

Vysoký denní příjem cholesterolu (1 g/den) snižuje syntesu cholesterolu. Hladiny lathosterolu mohou ale vzrůstat, pravděpodobně díky zvýšenému příjmu lathosterolu z potravy^{73,94}. Vegetariáni konzumující malá množství cholesterolu mají zvýšenou syntesu cholesterolu, ale také nižší koncentrace lathosterolu⁹⁵. U pacientů s reumatoidní artritidou převedených na veganskou dietu (zlepšuje symptomy nemoci) se syntesa cholesterolu ani plasmatické hladiny lathosterolu neměnily⁹⁶.

Metabolická přeměna lathosterolu

Lathosterol je oproti cholesterolu méně esterifikován (asi z 40 %, cholesterol z 70 %^{73,97,98}). Je možné, že aktivita acyl: cholesterol acyltransferas (ACAT) je ovlivněna přítomností nejbližší dvojné vazby k hydroxyly. Ta je v poloze 7 u lathosterolu, na rozdíl od polohy 5, která je u desmosterolu i cholesterolu. Aktivita lecithin:cholesterol acyltransferasy (LCAT) vůči lathosterolu je 83 % aktivity vůči cholesterolu⁹⁹.

Lathosterol podléhá snadno oxidačním změnám, proto není v oxidovaných částicích LDL přítomen. Transformuje se na sloučeniny 7β-hydroxy-cholesterol a 7-keto-cholesterol, dále na cholesterol-5α,6α-epoxid, 4β-hydroxy- a 6β-hydroxy-cholesterol¹⁰⁰.

7-dehydrocholesterol

Hladiny 7-dehydrocholesterolu

Pro stanovení hladin 7-dehydrocholesterolu je důležitá otázka jeho separace od iso-7-dehydrocholesterolu (který má dvojné vazby v jiném uspořádání: místo 5,7 je 6,8(9)), jež se v některých studiích opomíjí. Isomer je v plasmě přítomen řádově ve stejném množství jako

7-dehydrocholesterol¹⁰¹ a většinou se jeho oddělení nevěnuje velká pozornost; dále v textu bude zahrnut do 7-dehydrocholesterolu. Normální hladiny 7-dehydrocholesterolu se u zdravých jedinců pohybují v rozmezí okolo 0,3 $\mu\text{mol/l}$. Plasmatické hladiny 7-dehydrocholesterolu byly dokonce navrženy jako nepřímý ukazatel biosynthesy cholesterolu¹⁰².

V průběhu ontogenese se využívají obě dráhy biosynthesy cholesterolu: lathosterolová (např. Schwannovy buňky periferní nervové soustavy) i desmosterolová (oligodendrocyty v centrální nervové soustavě a ve fetálním mozku). V periferní nervové tkáni je možné používat k určení jejího stupně vývoje poměr cholesterol/7-dehydrocholesterol¹⁰³.

Metabolická přeměna 7-dehydrocholesterolu

V kůži může cytochrom P450 (CYP) isoforma 11A1 (tzv. P450scc) metabolisovat 7-dehydrocholesterol podobně jako cholesterol, vzniká 7-dehydropregnenolon¹⁰⁴; aktivita enzymu vůči 7-dehydrocholesterolu byla odhadnuta na 62 % aktivity vůči cholesterolu. *In vitro* bylo prokázáno, že oba proteiny důležité pro přenos sterolové molekuly do mitochondrie, protein izolovaný z metastasující lymfatické uzliny při rakovině prsu (metastatic lymph node 64 protein, MLN64) a steroidogenní akutní regulační protein (StAR), interagují s 7-dehydrocholesterolem¹⁰⁴.

Tvorba vitamínu D₃ z 7-dehydrocholesterolu

V epidermis se z 7-dehydrocholesterolu tvoří fotolytickým štěpením vazby mezi uhlíky 9 a 10 molekula previtaminu D₃. Následuje serie konfiguračních změn, které dají vznik (asi v jedné třetině) sloučenině vitamínu D₃. V lipidech kůže u morčete tvoří lathosterol asi 19 % z celkového obsahu sterolů, cholesterol 80 %¹⁰⁵, další enzymatickou přeměnou se z lathosterolu tvoří 7-dehydrocholesterol, jehož hladina je v epidermis také značně vyšší než v plasmě^{101,106}.

Meiosu aktivující steroly

Dva z meziproductů biosynthesy cholesterolu, 4,4-dimethyl-5 α -cholest-8,14,24-trien-3 β -ol (FF-MAS, z lanosterolu tvořen steroidní 14 α demethylasou), a 4,4-dimethyl-5 α -cholest-8,24-dien-3 β -ol (T-MAS, z FF-MAS tvořen steroidní D14 reduktasou), byly identifikovány jako látky hromadící se ve větším množství v gonádách¹⁰⁷. Haploidní zárodečné buňky nemají totiž syntésu cholesterolu zcela pod kontrolou SREBP, ale enzym lanosterol-14 α -demethylasa je hlavně regulován τ modulátorem cAMP responsivního elementu¹⁰⁸. Meiosu aktivující steroly pravděpodobně indukují dokončení meiosy oocytů (FF-MAS, T-MAS) a *spermatid* (T-MAS) dosud neznámými mechanismy, snad zahrnujícími aktivaci jaterního receptoru X (LXR α)¹⁰⁹, nebo G-proteinovou, popřípadě protein kinasovou C (PKC) signalizační kaskádu¹¹⁰.

Desmosterol

Obecně lze říci, že koncentrace desmosterolu dosahují v dospělosti polovičních až třetinových hodnot koncentrace lathosterolu^{88,92}, ale jednoleté děti mají hladiny desmosterolu okolo 3,3 $\mu\text{mol/l}^{111}$, což je asi dvoutřetinový podíl. Desmosterol je oproti lathosterolu sekretován v řádově menším množství žlučí⁹².

Desmosterol je ve vysokých koncentracích přítomen ve spermiiích, kde jeho zastoupení spolu s DHA je nejvyšší v bičíku¹¹². Vyšší zastoupení molekul s více dvojnými vazbami, jako desmosterol a DHA, by mohlo mít vliv na membránovou fluiditu, protože poměr desmosterol/cholesterol pozitivně koreluje s motilitou spermií¹¹³. Skvalen a desmosterol byly ve zvýšených koncentracích zaznamenány i v mateřském mléce¹¹⁴ a desmosterol ve vyvíjejícím se mozku¹¹⁵, snad v souvislosti s vyššími nároky nervového systému na syntézu cholesterolu v prenatálním a postnatálním období. Ve fetálním mozku je hladina desmosterolu, který je preferenčně užíván při výstavbě mozku (hlavně myelinaci) vysoká, kdežto u dospělých zde není detekován¹¹⁶.

Desmosterol je esterifikován v plasmě podobně jako cholesterol⁹⁸, aktivita LCAT vůči desmosterolu je 46 % aktivity vůči cholesterolu⁹⁹.

1.2.2 5 α -CHOLESTANOL

Tento sterol nepatří mezi prekursory cholesterolu, pochází z absorbovaného 5 α -cholestanolu (v malé části je ve všech savčích tkáních¹¹⁷) anebo je syntetisován z endogenního cholesterolu v játrech. Synthesa 5 α -cholestanolu z cholesterolu u savců probíhá přes 4-cholesten-3-on¹¹⁸ a v lidském organismu dosahuje hodnoty cca 5 mg/den¹¹⁷.

Koncentrace 5 α -cholestanolu v seru jsou v rozmezí 10 \pm 6 $\mu\text{mol/l}^{119}$, jiní autoři uvádějí rozmezí 6 \pm 2 $\mu\text{mol/l}^{120}$ nebo dokonce 0,3 až 1,8 $\mu\text{mol/l}^{117}$. 5 α -cholestanol je absorbován s účinností blízkou β -sitosterolu¹²¹, a proto změny hladin 5 α -cholestanolu v seru kopírují změny hladin rostlinných sterolů a v opačném smyslu i hladiny prekursorů cholesterolu¹¹⁷. U normálního jedince tedy vyšší hladiny 5 α -cholestanolu v seru odrážejí vysokou účinnost střevní absorpce sterolů a nízkou syntézu cholesterolu.

Aktivita LCAT vůči 5 α -cholestanolu je 96 % aktivity vůči cholesterolu⁹⁹, účinnost esterifikace v makrofázích dosahuje 75 % aktivity vůči cholesterolu¹²².

Zvýšené hladiny 5 α -cholestanolu

Serové koncentrace 5 α -cholestanolu u neléčených pacientů trpících cerebrotendinosní xanthomatosou dosahují řádově vyšších hodnot (až 140 $\mu\text{mol/l}$) v porovnání se zdravými kontrolami¹¹⁹. Zvýšené hladiny nalézáme také u primární biliární cirhózy¹²³ a sitosterolemie¹²⁴.

1.2.3 FYTOSTEROLY A ABSORPCE CHOLESTEROLU

(část textu byla publikována online v článku *M. Vecka, A Žák, E. Tvrzická: STEROLS, ESPECIALLY CHOLESTEROL AND PHYTOSTEROLS, IN HUMAN METABOLISM. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [http://www.eolss.net]*)

V lidském seru je zastoupeno kromě cholesterolu také malé množství necholesterolových sterolů, pocházejících z rostlinných zdrojů (tzv. fytosteroly), jako jsou hlavně kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol, avenasterol a brassikasterol (Obrázek 1.2.3.1). Rostliny syntetisují mnoho fytosterolů, ale podrobnosti biosynthesy jsou dosud málo prozkoumány¹²⁵.

1.2.3.1 Úloha a biosynthesa fytosterolů v rostlinné buňce

Funkce v membránách rostlinných buněk

Až na výjimky můžeme fytosteroly nalézt v membránách všech částí buňky, pouze v thylakoidních membránách jsou nahrazeny karotenoidy¹²⁶. Beta-sitosterol a kampesterol hrají v membránách rostlinných buněk podobnou úlohu jako cholesterol u živočichů¹²⁷, zastoupení cholesterolu v membránách rostlinných buněk je většinou nízké až zanedbatelné¹²⁸.

Synthesa rostlinných steroidů

Mezi sloučeniny odvozené od fytosterolů patří skupina rostlinných hormonů, brassinolidů, které jsou nejvíce zastoupeny v reprodukčních orgánech a podílejí se na regulaci dlouhivého růstu¹²⁹. Další sekundární metabolity sterolů v rostlinách jsou saponiny, glykosylované alkaloidy, kardenolidy a deriváty pregnanu¹²⁷, které jsou zapojeny v procesech obrany před houbovými patogeny, jako chuťové detraktory atd.¹³⁰. Stigmasterol (a možná i cholesterol) je zřejmě zapojen do procesů buněčné proliferace a metabolické regulace¹³¹.

Steroly společné rostlinám i živočichům

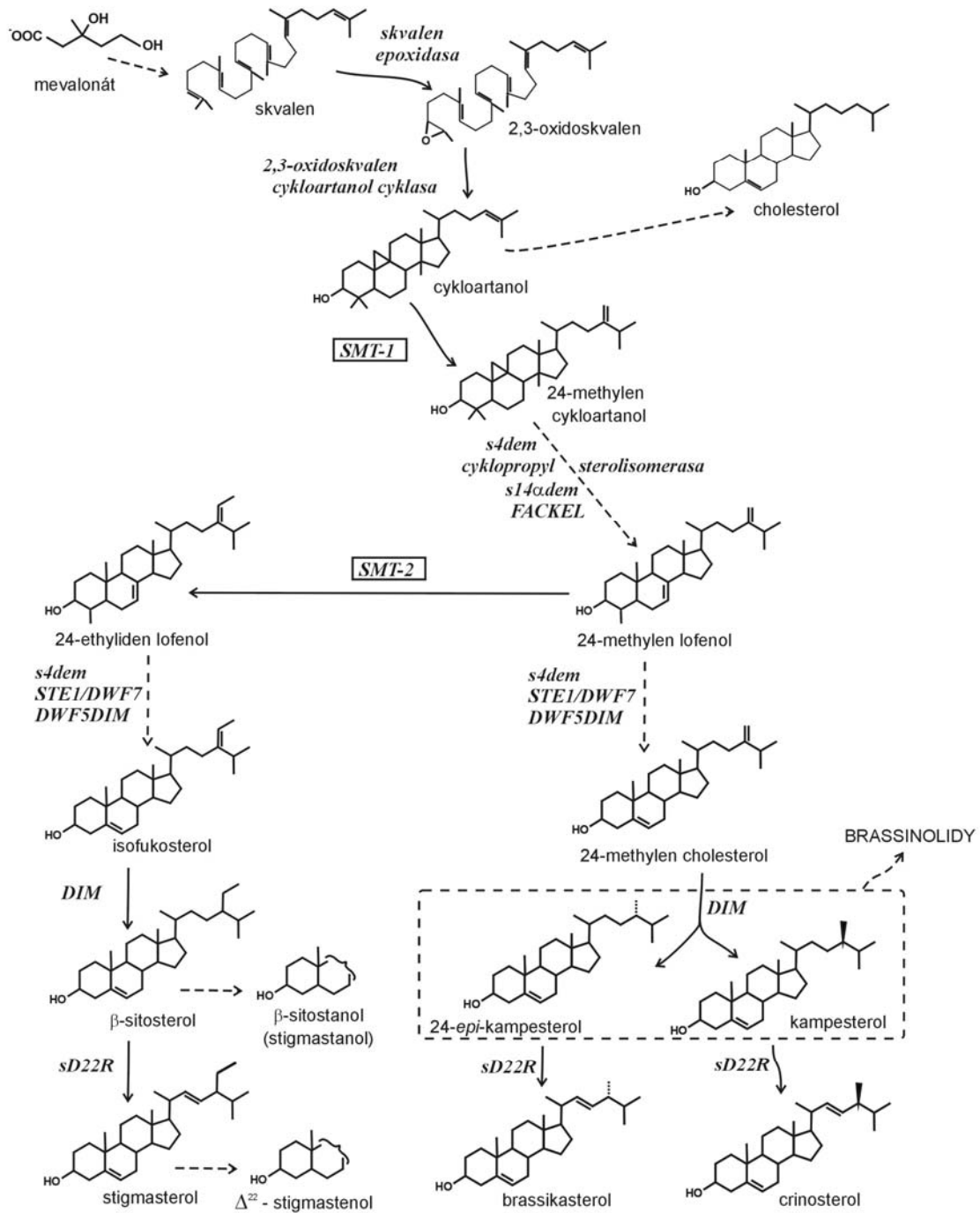
Ve špenátu (*Spinacia oleracea* L.) se vyskytuje lathosterol jako bioprekursor fytoekdysteroidů (rostlinných analogů růstových hormonů hmyzu), které rostliny syntetisují z mevalonátu⁷² a používají je k zabránění ecdysis u hmyzu. Vyšší rostliny mohou syntetisovat cholestanol podobně jako savci¹³². Cholesterol se v rostlinných zdrojích vyskytuje málo¹²⁷, pouze zástupci čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) obsahují cholesterolu více – až 15-20 % z celkového obsahu sterolů¹³³, hlavně v listech a stoncích. Cholesterol je v těchto rostlinách prekursorem syntesy různých glykoalkaloidů, např. solanidinu.

Fytosteroly jako součást diety

Denní příjem fytosterolů se pohybuje okolo 200 až 500 mg v závislosti na typu diety¹³⁶. Mezi nejvýznamnější zdroje patří rostlinné oleje (kukuřičný, sojový), ječmen, kešu, burské

oříšky, semena slunečnice a sezamu, celozrnná mouka^{137,138}. Býložraví měkkýši (zaděnky, ústřice, mušle, hřebenatky) i krabi mohou být též zdrojem fytosterolů¹³⁹. Vyšší rostliny obsahují molekuly fytosterolů buď volné, nebo vázané jako estery, β -D-glykosidy a jejich 6-*O*-estery. Glykosidy obvykle tvoří jednu desetinu z celkového obsahu fytosterolů¹⁴⁰.

Obrázek 1.2.3.1 Biosynthesa fytosterolů



s4dem – steroidní 4 demethylasa, SMT – steroidní methyltransferasa, *s14dem* – steroidní 14 α demethylasa, SI – sterolisomerasa, sD22R – steroidní D22 reduktasa, STE1/DWFMF7 – D7 steroidní 5-desaturasa, DWF5DIM – $\Delta^{5,7}$ -steroidní-7-reduktasa, FACKEL- $\Delta^{8,14}$ -steroidní-14-reduktasa, DIM - Δ^{24} -steroidní reduktasa/isomerasa; upraveno podle^{134, 135}.

1.2.3.2 Absorpce sterolů

Struktura molekuly

Molekuly fytosterolů obsahují oproti molekule cholesterolu ještě methylové (ethylové) substituenty ve vedlejším řetězci, které vyčnívají z poměrně plochého tetracyklického systému a které přednostně směřují molekuly fytosterolů na exofaciální stranu lipidové dvojvrstvy. Tato modifikace struktury sterolového skeletu může mít neblahé důsledky pro elektrochemické vlastnosti¹⁴¹ a fluiditu¹⁴² buněčných membrán vyšších živočichů, a proto jsou fytosteroly exkretovány enterocyty ihned zpět do střeva. Zvýšení obsahu fytosterolů v buněčných membránách může interferovat s funkcí důležitých transportních proteinů účastnících se sekrece žluče, a tak snížit sekreci s následnou cholestasou¹⁴³. Navíc fytosteroly s dvojnou vazbou na C22 (stigmasterol, brassikasterol a ergosterol) jsou kompetitivní inhibitory DHCR24¹⁴⁴. Fytosteroly se kumulují u potkanů preferenčně v nadledvinách a ovariích, tedy tkáních s vysokou steroidogenní aktivitou¹⁴⁵.

Absorpce sterolů

Vstup molekuly sterolů do enterocyty

Mechanismus absorpce sterolů z potravy je v současné době předmětem intenzivního zkoumání¹⁴⁶. Po hydrolyse steryl esterů jsou steroly solubilizovány do micel, ve kterých fytosteroly pravděpodobně vytěsňují cholesterol¹⁴⁷. Další přechod molekuly cholesterolu z micely k povrchu enterocyty zahrnuje difusní krok v prostředí nemixované vrstvy vodné fáze a mucinosního povrchu apikální části enterocyty. Absorpce cholesterolu (nikoli mastných kyselin) je snížena na polovinu u myši, kterým chybí gen *MUC-1* kódující jeden z mucinů apikální membrány enterocyty¹⁴⁸.

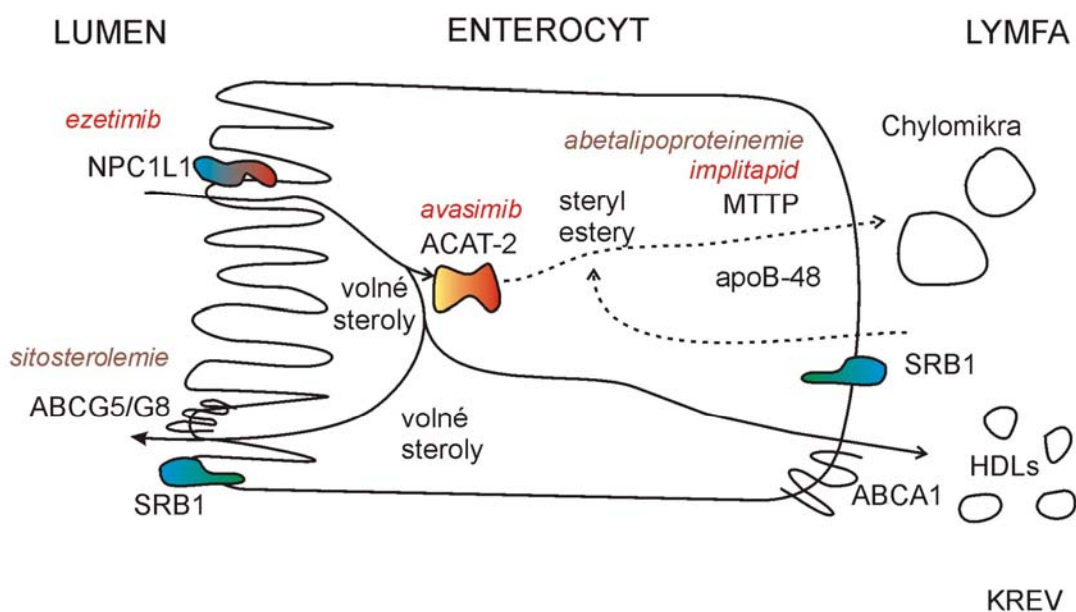
Na apikální straně jejunálních enterocytů jsou steroly přesouvány do buňky pomocí receptorového proteinu NPC1L1¹⁴⁹ nebo *scavengerového* receptoru třídy B typ 1 (SR-B1)¹⁵⁰. Přehled dějů je naznačen na [Obrázku 1.2.3.2](#). Molekulární mechanismus přenosu sterolové molekuly zahrnuje mimo receptorů i další kofaktory, protože pouhá exprese NPC1L1 nevede ke zvýšenému přesunu sterolů do buňky¹⁴⁹. Jedna studie dokonce uvádí, že NPC1L1 není lokalizován na apikální membráně enterocyty, ale v cytosolárním prostoru, kde se spojuje s malou GTPasou rab5¹⁵⁵. Fytosteroly jsou tak absorbovány v proximální části tenkého střeva podobným mechanismem jako cholesterol.

Zpětná exkrece z enterocyty

Na apikální části buněčné membrány enterocyty jsou exprimovány molekuly ABC transportérů (ABCG5 a ABCG8 fungující jako heterodimer), které pumpují steroly zpět

z enterocyty do lumen střeva^{156,157}. U zdravých jedinců se absorpční účinnost pro fytosteroly pohybuje okolo 3–7 %, přičemž účinnost klesá v řadě kampesterol > β -sitosterol > stigmasterol > kampestanol > sitostanol^{158,159} oproti cholesterolu, kde se absorpce pohybuje okolo 50 % i více¹⁶⁰. Vyřazení jejunální části absorpce resekcí vede k poklesu frakční absorpce kampesterolu na desetinu a β -sitosterolu na polovinu, přičemž při náhradě celého tenkého střeva autotransplantačním štěpem jejunu se dokonce β -sitosterol lépe absorbuje než kampesterol¹⁶¹.

Obrázek 1.2.3.2 Absorpce sterolů v enterocyty



NPC1L1 – Niemann-Pick like 1 protein, SRB1 – HDL receptor, ACAT – acyl -CoA cholesterol acyltransferasa, MTP – mikrosomální triglyceridový transferový protein; červeně jsou znázorněny látky inhibující funkci příslušných proteinů, hnědě jsou vyznačeny nemoci způsobené nedostatečnou nebo chybějící aktivitou těchto proteinů. Upraveno podle^{149,151-154}.

Enterocyt

Cholesterol podstupuje v enterocyty reesterifikaci pomocí ACAT, aby mohl být inkorporován do chylomikronových částic. Fytosteroly jsou reesterifikovány asi 60 krát pomaleji¹⁶², což hraje důležitou roli ve výsledné absorpční diskriminaci mezi fytosteroly a cholesterolem. Vlastní esterifikace fytosterolů je minimální¹⁶³, esterifikace β -sitosterolu je menší než kampesterolu¹⁶⁴. Isoenzym ACAT-2, který je exprimován preferenčně na apikální straně enterocyty a v játrech, hraje důležitou roli v procesu absorpce sterolů, protože myši postrádající aktivitu ACAT-2 byly resistantní k hypercholesterolemii indukované dietou¹⁶⁵.

Celková účinnost absorpce cholesterolu

Z velkého množství studií vyplývá, že po zvýšení příjmu cholesterolu o 100 mg/den je

možné očekávat zvýšení plasmatické koncentrace cholesterolu o 0,05-0,06 mmol/l. Pokud dojde ke zvýšení nad toto rozmezí, je jedinec klasifikován jako hyperresponder a pokud se zaznamená nižší zvýšení než zmíněné rozmezí, jako hyporesponder. Hyporespondeři mají schopnost udržovat homeostasu cholesterolu snížením jeho syntesy (nebo absorpce), popřípadě zvýšením tvorby žluče. Naproti tomu hyperrespondeři mají basální syntesu cholesterolu nízkou a nemají schopnost ji příliš ovlivňovat. To se projeví při cholesterolové zátěži, kdy dosahují znatelného zvýšení plasmatické koncentrace cholesterolu oproti hyporesponderům.

Rozdílná účinnost absorpce cholesterolu z lumen střeva je způsobena např. různými mutacemi v genech pro transportní molekuly ABCG5/G8¹⁶⁶, NPC1L1¹⁶⁷ a snad také fenotypem apoE - jedinci nesoucí alelu $\epsilon 4$ měli mít nejvyšší schopnost absorbovat cholesterol¹⁶⁸, ovšem další studie toto neprokázaly¹⁶⁹. Rozdílné výsledky studií mohou být způsobeny rozdílným obsahem cholesterolu v dietě nebo rozdílnou hodnotou hmotnostního indexu BMI¹⁶⁰. Apoprotein E je důležitý pro vychytávání lipoproteinů játry, vazba apoE řetězců exprimovaných alelami $\epsilon 4$ a $\epsilon 3$ je účinnější než u $\epsilon 2$, u jedinců nesoucích alelu $\epsilon 4$ je vyšší hladina LDL a vyšší riziko aterosklerosy¹⁷⁰.

Přechod do lymfatického systému

V souhlase s nižší esterifikací fytosterolů v enterocyty je β -sitosterol obsažen především na povrchu vytvořených chylomikrů a pouze menší část (12 %) je esterifikována a transportována jako steryl ester v jádru částice¹⁷¹. Přechod (chole)sterolu do oběhu, který není závislý na apoB částicích, je možný, protože u pacientů s abetalipoproteinemií se účinnost absorpce cholesterolu pouze snížila z 45 na 30 %¹⁷².

1.2.3.3 Metabolismus fytosterolů

Koncentrace fytosterolů v plasmě koreluje s frakcionovaným příjmem cholesterolu za fyziologických podmínek^{173,174} i podmínek, jako hypertriacylglycerolemie¹⁷⁵, malabsorpce tuku při resekcii střeva¹⁷⁶ i celiakie¹⁷⁷. Stanovení hladin fytosterolů se proto používá jako marker absorpce cholesterolu místo náročnějších technik, jako měření bilance sterolů mezi exkrecí a příjmem.

Plasmatické koncentrace jednotlivých fytosterolů dosahují hodnot 1-40 $\mu\text{mol/l}$ ¹⁷⁸, tyto hodnoty jsou u konkrétního jedince poměrně stálé, mezi jednotlivci dosahují za konstantního přísunu fytosterolů koncentračního rozpětí až jednoho řádu. Navíc korelace plasmatických hladin a dietního přísunu pro β -sitosterol je malá⁸⁷. Proměnlivost hladin fytosterolů mezi jedinci je tedy dána z větší části geneticky¹⁵⁶, a není tak závislá na věku (tělesné hmotnosti) na

rozdíl od hladin prekursorů cholesterolu⁸⁷.

Po případné resorpci se fytosteroly eliminují játry do žluče¹⁷⁸ za pomoci stejných ABC transportérů jako ve střevě¹⁵⁷. Ovšem aktivátory jaderného transkripčního faktoru LXR, pod jehož kontrolou je i exprese transportních molekul ABCA1 a ABCG5/G8, zvyšují exkreci fytosterolů žlučí a feces mechanismem nezávislým na ABCA1¹⁷⁹. Exkrece sterolů do žluče pomocí ABCG5/G8 je závislá na expresi další transportní molekuly ABCB4 (MDR2)^{180,181}.

Přechod sterolů z krevního oběhu matky na kojence a hladiny cholesterolu (i noncholesterolových sterolů) v mateřském mléce vykazuje velké mezidruhové i individuální rozdíly¹⁸². U člověka se obsah cholesterolu v mateřském mléce mění v průběhu laktace, neboť reflektuje nutriční požadavky kojence¹⁸³. Transportér ABCG5/G8 byl nedávno prokázán i v bovinní mléčné žláze¹⁸².

Přeměna molekuly fytosterolu

Molekuly fytosterolů jsou substráty podobných reakcí jako molekula cholesterolu. Esterifikační reakce probíhají pomaleji (cca 60x) a principiálně možná je i tvorba fytosteroidních hormonů. U obratlovců (savci, člověk) nebyla zaznamenána žádná aktivita konvertující fytosteroly na C-24 žlučové kyseliny¹⁸⁴, protože 7 α -hydroxylace (rychlost limitující krok tvorby C-24 žlučových kyselin) je na tomto skeletu nemožná. Beta-sitosterol může být u potkanů metabolisován na hydroxylované C-21 žlučové kyseliny¹⁸⁵ bez přítomnosti hydroxyly na C7.

Oxidované deriváty fytosterolů se tvoří už v dietě, jejich přechod do lymfatického systému apoE deficientní myši zvyšuje hladinu oxysterolů odvozených od cholesterolu bez vlivu na rozvoj atherosklerosy¹⁸⁶. U zdravých jedinců jsou oxidované fytosteroly přítomny v plasmě v nízkých koncentracích hlavně jako 5,6-epoxydy; nejvíce jsou zastoupeny deriváty β -sitosterolu (řádově desetiny $\mu\text{mol/l}$), deriváty kampesterolu mají koncentraci ještě o řád nižší¹⁸⁷.

1.2.3.4 Mechanismus účinku fytosterolů

Snížení plasmatické hladiny cholesterolu

Fytosteroly obecně snižují hladinu celkového a LDL cholesterolu o 10-15 % v závislosti na velikosti přísunu exogenního cholesterolu. Mechanismus spočívá zřejmě ve výše zmíněné kombinaci blokování enterocytární ACAT a nasedání na proteinové transportní molekuly pro (chole)sterol. Hypocholesterolemické účinky byly prokázány u lidí i zvířat¹⁷⁸, β -sitosterol byl dokonce zkoušen jako lék volby u dětí s heterozygotní formou familiární hypercholesterolemie¹⁸⁸. V současné době se fytosteroly (fytostanoly) používají také jako

potravní doplňky¹⁸⁹.

Rostlinné stanoly (analogy fytosterolů s nasyceným steranovým skeletem) mohou být na rozdíl od krystalických fytosterolů snadněji konzumovatelné. Navíc jsou minimálně absorbovány a snižují i hladiny fytosterolů v plasmě. Snižují ovšem také hladinu β -karotenu, i když malabsorpce vitaminů rozpustných v tucích spojená s užíváním fytostanolů nebyla zatím popsána¹⁹⁰. Fytostanoly mají větší vliv na hladinu celkového cholesterolu a fytosteroly na hladinu LDL-C^{191,192}, novější studie oběma skupinám přisuzují podobné účinky¹⁹³. Fytostanoly pouze inhibují příjem cholesterolu nasedáním na transportní molekuly enterocyty nebo účinnější blokací aktivity ACAT-2 enterocyty. Do krevního oběhu se totiž dostanou daleko méně než fytosteroly. Fytosteroly se dostanou i do cirkulace a inhibují i jaterní ACAT, takže působí přímo proti tvorbě LDL-C.

Ostatní příznivé účinky fytosterolů

Příjem fytosterolů je v negativní korelaci k riziku rakoviny prsu¹⁹⁴ a žaludku¹⁹⁵. Na druhé straně podávání β -sitosterolu samotného i v kombinaci s jeho glukosidem modulovalo růst estrogen-dependentních lidských buněk rakoviny prsu *in vitro*¹⁹⁶. Beta-sitosterol je slabý agonista estrogenních receptorů α a β ($\beta \gg \alpha$)¹⁹⁷; ve směsi se svým glykosidem vykazuje imunomodulační účinky^{198,199}, které mohou souviset s vlivem β -sitosterolu na hladinu cholesterolu a také s deficiencí apoE²⁰⁰. Některé studie připisují fytosterolům antikoagulační účinky, jako redukci počtu krevních destiček, snížení hladin tkáňového aktivátoru plasminogenu nebo redukci hladin fibrinogenu v plasmě¹⁷¹.

Vedlejší účinky fytosterolů

Dlouhodobé užívání fytosterolů nemá žádné pozorovatelné vedlejší účinky. U velmi vysokých dávek (~ 25 g/den) dochází někdy k zažívacím obtížím²⁰¹, u krys (0,5-5 mg/kg den s.c.) došlo k potratům²⁰² nebo poklesu koncentrace spermií²⁰³.

1.3 VZTAH METABOLISMU MASTNÝCH KYSELIN A STEROLŮ

Mastné kyseliny a steroly jsou dvě strukturně zcela odlišné skupiny lipidů. Jejich metabolismus je ale provázán v několika oblastech - molekuly (chole)steryl esterů jsou složeny ze sterolu esterifikovaného mastnou kyselinou a cholesterol i mastné kyseliny mohou být ligandy regulačních elementů (transkripčních faktorů), na jejichž složitě vzájemně provázaných vztazích a interakcích s ligandy závisí exprese nekonstitučních genů v celém organismu. Navíc biosynthesa jak mastných kyselin, tak (chole)sterolu vyžaduje acetyl-CoA a nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH), takže obě skupiny sloučenin soutěží o společný pool stavebních jednotek a redukčních ekvivalentů. Složitost metabolických vazeb mezi mastnými kyselinami a steroly nedovoluje zcela oddělit tyto funkční aspekty, takže následující text je jen pokusem o pohled z několika rovin.

Absorpční proces v tenkém střevě

Některé oxidované deriváty mastných kyselin (13-hydroxy-oktadeka-9,11-dienová kyselina) mohou ovlivňovat solubilizaci cholesterolu. Jejich konformace může být totiž podobná strukturám litholových kyselin²⁰⁴. Proces absorpce lipidů je ukončen zpětnou absorpcí žlučových kyselin v ileu. Exprese ileálního vazebného proteinu pro žlučové kyseliny (I-BABP) je pod kontrolou transkripčních faktorů FXR, LXR a SREBP-1c, které jsou zčásti ovlivňovány vazbou mastných kyselin²⁰⁵.

Metabolismus lipoproteinů

Distribuce jednotlivých mastných kyselin mezi lipoproteinovými a lipidovými třídami plasmy je ovlivněna několika faktory, například tkáňově specifickými požadavky na obsah n-3 a n-6 PUFA²⁰⁶ a substrátovou specifitou enzymů lipoproteinové kaskády²⁰⁷.

Při stejném příjmu cholesterolu a zachování jeho rovnováhy v játrech u křečka byl pozorován rozdíl mezi inkorporací MA a OA do CE v hepatocytu. Kyselina myristová zvýší LDL-C, protože koncentrace hepatocytárních CE je snížena, aktivita LDL receptoru snížena a produkce částic LDL zvýšena. Kyselina olejová má opačné účinky - zvýší koncentraci CE v hepatocytu a aktivitu LDL receptoru; produkce částic LDL je snížena²⁰⁸. Při zvýšeném regulačním poolu volného cholesterolu (nižších hladinách CE) je tak aktivita fragmentu SREBP nižší, a tím je nižší tvorba LDL receptoru²⁰⁹⁻²¹¹. Podobné vztahy se mohou nalézt i pro jiné mastné kyseliny (Tabulka 1.3.1).

Pokud se obsah cholesterolu v dietě mění, dochází k ovlivnění biosynthesy mastných kyselin. Zvýšený obsah cholesterolu indukuje D9D (tvořící hlavně OA) a je bez vlivu nebo potlačuje aktivitu D6D a D5D⁷. Tyto změny v biosynthetických aktivitách jsou v souhlasu

s konceptem funkce CE jako zásobní formy cholesterolu. V CE je nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou LA, která pochází přímo z diety a k její tvorbě nejsou nutné elongační ani desaturační aktivity, OA je zastoupena na druhém místě, takže je třeba podpořit její tvorbu indukci D9D, která ji tvoří z kyseliny stearové (SA, 18:0).

Tabulka 1.3.1 Vliv mastných kyselin na hladinu plasmatického cholesterolu

Typ mastné kyseliny	TC	LDL-C	HDL-C	Poznámka	Citace
SFA	krátké ~, ↑	krátké ~, ↑	krátké ~, ↑		212,213
SA (18:0)		~, ↓		rychlá konverze na OA, slabý substrát pro tvorbu TAG a CE	212,213,214
MFA	↓	↓	↑		215
OA (18:1n-9)	↓	↓	↑		213
PUFA n-3	↓	↓x↑ <i>ppd</i>	↑, ↓	jaterní ACAT ↑	216,217
PUFA n-6	↓	↓	↑, ↓	jaterní ACAT ↑	216,217
CLA	~	~	~	t10c12 ↓ TC?	218
TFA	↑	↑	~, ↓	↑ Lp(a)	215,217,219

Efekty mastných kyselin jsou naznačeny za předpokladu, že se nahrazuje obsah nasycených mastných kyselin v dietě. ACAT – acyl:cholesterol acyltransferasa, TC – celkový cholesterol, ↓ - snížení, ↑ - zvýšení, ~ - beze změny, ppd – průměr nejčastěji se vyskytující částice (paek particle diameter)

Přítomnost fytosterolů v olejích – identifikace vlastního hypocholesterolemického agens

Vliv jednotlivých tříd mastných kyselin na hladiny cholesterolu je nutné uvádět v souvislosti s obsahem fytosterolů v příslušných intervenčních dietách, aby se dal jednoznačně identifikovat. Diety bohaté na PUFA obsahují obvykle vysoké hladiny fytosterolů (řádově g/kg), diety s vyšším obsahem MFA (např. olivový olej) spíše nižší hladiny fytosterolů²²⁰, ale i tyto minoritní složky by mohly stát za příznivými vlivy středomořské stravy s bohatým zastoupením panenského olivového oleje²²¹.

Genová exprese

Nenasycené mastné kyseliny působí jako antagonisté oxysterolů v případě vazby oxysterolu na LXR α,β (AA > LA > OA)²⁹. Nasycené mastné kyseliny nemají žádný efekt. PUFA mohou také interferovat přímo (nebo přes kompetici PPAR α s LXR α pro vazbu na RXR α) s vazbou LXR α /RXR α heterodimeru na LXR regulační element²²². Vícenenasycené mastné kyseliny i acetoacetát působí inhibičně na aktivitu ABCA1²²³, zřejmě v důsledku posttranslační inhibice vazby oxysterolů na LXR α a následné down-regulace transkripce SREBP nebo podporou degradace ABCA1³⁴. V konečném důsledku se snižují hladiny HDL.

Steroly jako ligandy jaderných receptorů PPAR dosud nebyly prokázány, první práce zabývající se možností ligace sterolu na PPAR α se objevila poměrně nedávno²²⁴. Vzhledem

k tomu, že jako ligand aktivující PPAR α byl identifikován kampestenon (kampest-5-en-3-on neboli (24R)-24-methyl-cholest-5-en-3-on), který není normálně v plasmě přítomen nad mezi detekce pomocí GC-MS (1 ng/ml¹⁸⁷), není klinický význam tohoto faktu zřejmý.

Interakce cholesterolu a mastných kyselin v membránách

Interakce mezi steroly a acylovými skupinami membránových fosfolipidů je hlavním faktorem určujícím fyzikální vlastnosti (fluiditu, membránový potenciál a permeabilitu) biologických membrán, jejichž zachování je pro buňku životně důležité. Na hladinu sterolů v buňce je citlivá proteolytická maturace jaderného transkripčního fakturu SREBP-2. Jiný člen rodiny SREBP, SREBP-1c, aktivuje transkripci genů důležitých pro syntézu a desaturaci mastných kyselin, ovšem maturace je závislá nikoli na cholesterolu, ale na insulinu²²⁵. Role pro SREBP proteiny tak spočívá v integraci signálů odrážejících složení membrán a biosyntézu lipidů.

Vzájemný poměr cholesterolu a mastných kyselin ve fosfolipidových molekulách *raftu* určuje do značné míry fluiditu raftu a tím i jeho vlastnosti. Zvýšení obsahu cholesterolu v membránách zvyšuje sílu interakcí mezi řetězcí mastných kyselin a zeslabuje vazby mezi polárními skupinami a obráceně²²⁶, což může mít vliv na aktivitu proteinů počáteční fáze lipoperoxidace asociovaných s membránou²²⁷, schopnost endocytosy vesikul a jejich následné invaginaci²²⁸.

Intracelulární transport lipidů

Cholesterol i mastné kyseliny patří mezi početnou skupinu ligandů SCP-2. Ačkoliv byl tento protein objeven před více než 30 lety, jeho přesné fyziologické funkce zůstávají nejasné. Zdá se, že cholesterol se na SCP-2 váže jen velmi pomalu a mastné kyseliny jej z vazby velmi snadno vytěsní²²⁹.

Klinický vztah necholesterolových sterolů a mastných kyselin

Klinickým významem vzájemných vztahů necholesterolových sterolů a mastných kyselin se doposud nikdo nezabýval. V literatuře se objevují pouze studie o vlivu mastných kyselin na hladinu cholesterolu, popřípadě kombinaci necholesterolových sterolů a PUFA n-3 v prevenci ischemické choroby srdeční (IChS)¹⁴⁷.

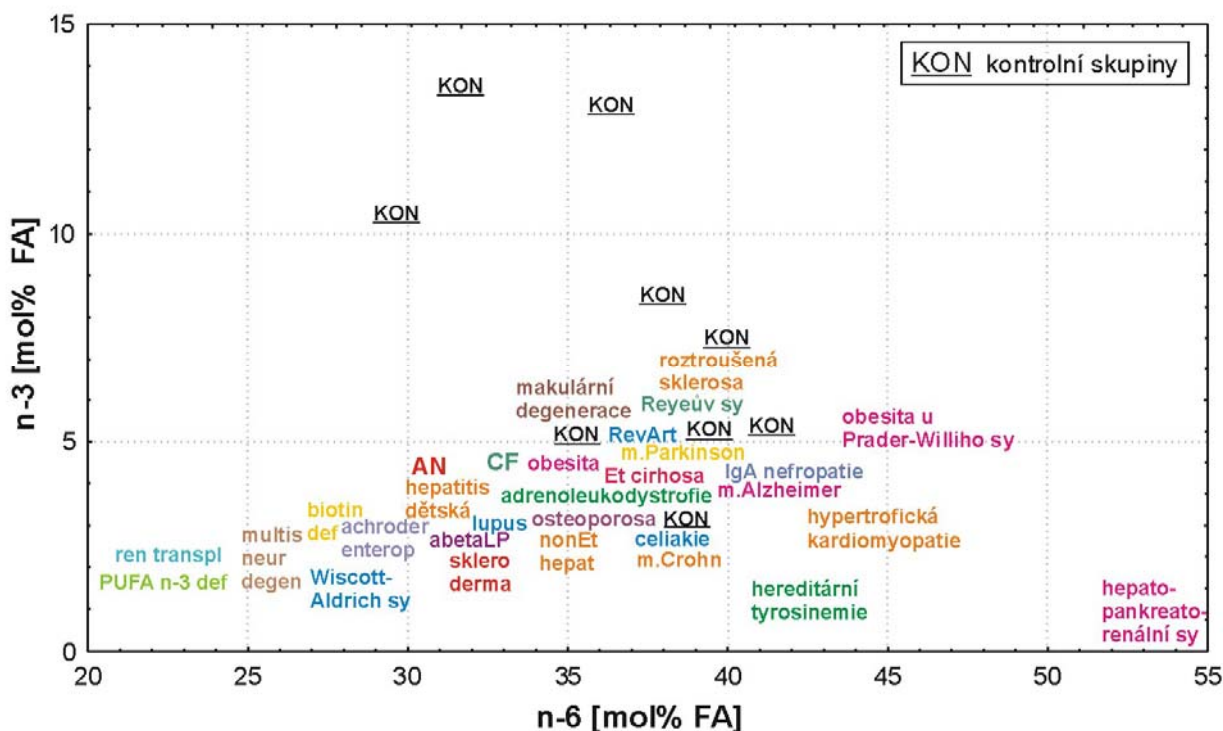
1.4 MASTNÉ KYSELINY A NECHOLESTEROLOVÉ STEROLY V KLINICKÉ PRAXI

1.4.1 MASTNÉ KYSELINY A MALNUTRIČNÍ STAVY

Klinický význam mastných kyselin je úzce spojen se stavy, které mohou (nepříznivě) ovlivňovat metabolismus lipidů, ať už ve smyslu deficience nebo akumulace. Stanovení hladin mastných kyselin v plasmě se využívá hlavně při diagnosách peroxisomálních poruch, kdy jsou přítomny netypické kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (Refsumova choroba, adrenoleukodystrofie nebo poruchy β -oxidace²³⁰). Protože některé mastné kyseliny lidský organismus neumí syntetisovat *de novo*, při potvrzení deficience (např. analysou mastných kyselin) je indikována jejich suplementace²³¹.

Nepřímá propojení metabolismu mastných kyselin a patofysiologických procesů jsou velmi pestrá a přesahují rámec této kapitoly; o vztahu zastoupení n-3 a n-6 PUFA ve fosfolipidech (PL) plasmy u kontrol a několika skupin pacientů si můžeme učinit představu podle obrázku 1.4.1.1.

Obrázek 1.4.1.1 Hladiny n-3 a n-6 PUFA v plasmatických PL



zkratky: AN – mentální anorexie, CF – cystická fibrosa, def. – deficience, Et – ethylická, FA – mastné kyseliny, m. – nemoc, ren transpl – renální transplantace, RevArt – revmatoidní artritida, sy – syndrom; upraveno podle²³¹.

1.4.1.1 Některé patofysiologické stavy a mastné kyseliny

Deficience mastných kyselin

Od roku 1929, kdy George a Mildred Burrovi začali experimentovat s dietami bez obsahu tuků²³², se koncept esenciality mastných kyselin rozšířil z deficience n-6 PUFA i na možnost čisté deficience n-3 PUFA^{231,233}. Otázka dostatečné synthesy OA u savců není ještě

dořešena, u krys je OA podmíněně esenciální²³⁴ a u člověka je SA velmi rychle metabolisována na OA²¹⁴.

Mentální anorexie

U mentální anorexie je zastoupení mastných kyselin v plasmatických fosfolipidech jiné než u pouhé deficience esenciálních mastných kyselin nebo chronické malnutrice²³⁵. Nicméně tento profil je také změněn v důsledku karence PUFA²³⁶, jejichž snížený přísun může být jedním ze spouštěcích mechanismů tohoto onemocnění²³⁷. Logickým důsledkem je i nižší zastoupení elongačních i desaturačních produktů PUFA, což vede ke kompenzačním mechanismům snažícím se zachovat membránovou fluiditu např. produkcí alternativních řetězců²³⁵ odvozených od *de novo* syntetisovaných mastných kyselin, nebo i zvýšením obsahu rozvětvených mastných kyselin.

Proteino-energetická malnutrice

Deficience PUFA může být spojena také s proteino-energetickou malnutricí (PEM). Elongační enzymatické aktivity jsou obvykle za deficience PUFA zvýšeny a desaturasy působící na n-6 PUFA vykazují sníženou aktivitu u podvyživených dětí²³⁸, což se projevuje jako úbytek zastoupení n-6 PUFA a zvýšení zastoupení n-9 mastných kyselin v PL plasmy a erytrocytárních membrán²³⁹. Ve většině studií, které rozdělily PEM na marantický a kwashiorkorový typ, se projeví rozdíly v zastoupení mastných kyselin v plasmě mezi těmito skupinami²⁴⁰, jen Koletzko²⁴¹ žádný rozdíl nezaznamenal, navíc často používaný poměr Meadovy kyseliny (20:3n-9) a AA se zde neukázal jako vhodný pro indikaci PUFA deficience. U kwashiorkorového typu je popisováno nižší zastoupení LA a metabolitů ALA, jako například DHA²⁴².

Proteino-energetická malnutrice není vždy nutně spojena s deficiencí PUFA – u marockých podvyživených dětí byly u všech stupňů PEM zjištěny zvýšené hodnoty parametrů oxidačního stresu, ale ne deficience PUFA, která se projevila jen u těžké PEM. U všech skupin PEM bylo zvýšeno zastoupení MFA a aktivita D9D²⁴³. Jako časné markery PEM by mohl být používán vzestup aktivity D9D a zvýšená lipoperoxidace bez deficience PUFA²⁴⁴.

Snížený přísun PUFA za podmínek PEM nepříznivě ovlivňuje u dětí výstavbu strukturálních lipidů nervové tkáně. Výživa obohacená o PUFA n-6 a n-3 (na rozdíl od suplementace jen EFA) může být prospěšná pro dosažení podobného profilu mastných kyselin v plasmě a erythrocytech jako u dětí kojených mateřským mlékem²⁴⁵. U nigerijských novorozenců byla zaznamenána nedostatečná přeměna LA na AA, hlavně elongace LA²⁴⁶.

Obesita

Obesní děti mají vyšší hladiny n-6 PUFA než neobesní kontroly²⁴⁷, zřejmě zčásti díky

zvýšené aktivitě D6D. Ta je stimulována vyšší hladinou insulinu²⁴⁸ běžnou u obesních dětí. Pro metabolický syndrom u dětí (dyslipidemie + hyperinzulinemie + hypertenze + porušená glukosová tolerance + androidní akumulace tuku) je typické snížení zastoupení LA²⁴⁹. Procentuální zastoupení AA v plasmatických PL u obesních dospělých bylo popsáno jako snížené²⁵⁰, naproti tomu je popisováno její zvýšené zastoupení v CE²⁵¹. Zvýšené zastoupení Meadovy kyseliny (20:3n-9) i EPA v CE svědčí spíše pro maldistribuci AA v jednotlivých lipidových třídách než pro změněnou produkci n-6 PUFA, která by se projevila nižším zastoupením n-9 a n-3 analogů²⁵².

Další patofysiologické stavy

Kyselina linolová je méně zastoupena v TAG i CE *u starších (> 75 let) žen*, vyšší příjem proteinů ze svalové hmoty zvířat je pravděpodobně zodpovědný za zachování hladin AA i v pokročilém věku²⁵³. Zastoupení POA je zvýšeno a snížena je účinnost terminálních enzymatických přeměn PUFA²⁵³. Dlouhověkost (> 90 let muži i ženy) je spojena s vyšším zastoupením DHA i 22:4n-3 (?) v LDL částicích než o 10 let mladších kontrol²⁵⁴.

Hypermetabolisující pacienti na jednotkách intenzivní péče při dodávání totální parenterální výživy vykazují rozvoj mírné deficiencie EFA, kterou lze jen zčásti upravit suplementací lipidů. Dodatečné podávání lipidů podporuje konversi AA na kyselinu dokosapeantenovou (22:5n-6)²⁵⁵. *Septikemie* snižuje zastoupení kyseliny γ -linolenové (GLA, 18:3n-6), dihomo- γ -linolenové (20:3n-6) a AA z n-6 řady a EPA z n-3 řady PUFA v PL plasmy²⁵⁶.

Pokročilá stadia *jaterní cirhosis* a *akutní hepatitidy*²⁵⁷ i *cholestasy*²⁵⁸ jsou spojena s nedostatkem PUFA. Deficit PUFA u cirhosis je výsledkem deficiencie EFA i biosynthetických aktivit²⁵⁷, navíc je spojena s PEM, přičemž stupeň malnutrice přímo ovlivňuje míru poklesu zastoupení PUFA v plasmě. Poměr LA/AA je zvýšen a poměr prekursorů a produktů D5D se nezměnil, spíše byla inhibována aktivita D6D a elongasy C-18 mastných kyselin²⁵⁹. *Nealkoholická steatohepatitis* je v některých studiích považována za výsledek aktivace jaderných receptorů PPAR α ; zvýšení mikrosomální i mitochondriální β -oxidace vede k nadprodukci ROS z molekul mastných kyselin. Hepatocelulární poškození steatosních jater je právě iniciováno ROS²⁶⁰.

1.4.1.2 Terapie mastnými kyselinami

Omezení nutriční terapie

Podávání PUFA se v nutriční praxi dlouho neprovádělo kvůli obavám z možného zvýšení oxidačního stresu²⁶¹, protože řetězce těchto kyselin obsahují několik dvojných vazeb,

a tedy jsou náchylnější k oxidačním změnám. Totální parenterální výživa bez lipidů, která neobsahovala EFA, dříve či později vedla k jejich deficienci²³¹ a EFA bylo nutné do výživy dodávat. Později se ukázalo, že zvýšený příjem PUFA n-3 potravou (oproti řadě n-6) vede k zvýšené transkripci antioxidantních enzymů – a snížené transkripci enzymů podílejících se na produkci reaktivních kyslíkatých a dusíkatých sloučenin²⁶². Bezpečné jsou dávky až 7,7 g (EPA + DHA)/den, i když se v delším časovém horizontu (180 dnů) může projevit pokles antioxidantní kapacity u červených krvinek²⁶³.

Další efekt PUFA, který bylo potřeba objasnit před uvedením PUFA do širší klinické praxe, byl vztah metabolismu sacharidů a polynenasycených mastných kyselin u pacientů s DM, u kterých panovaly obavy ze zhoršení glukosové homeostasy při podávání PUFA, způsobené např. vyšším energetickým příjmem²⁶⁴. Metaanalytické zpracování dat z různých studií tyto obavy nepotvrdilo²⁶⁵.

Příznivé účinky terapie

Návrat k původnímu poměru n-6/n-3 PUFA

Před vznikem a v průběhu rané fáze zemědělství byl jídelníček rodu *Homo* velmi pestrý a přísun esenciálních mastných kyselin byl charakterisován poměrem n-6/n-3 PUFA okolo 1:1²⁶⁶. Nástup zemědělství podstatně zredukoval náš jídelníček, protože se více spoléhá na nově vyšlechtěné odrůdy obilovin (kukuřice, pšenice a rýže), které obsahují hlavně n-6 oproti n-3 PUFA²⁶⁷. Mechanisace a automatisace v zemědělství vedly k intenzivnějšímu používání krmiv obsahujících hlavně n-6 PUFA (kukuřice a pšenice) a následně tak k dalšímu snižování zastoupení obsahu n-3 PUFA v dietě. Další popud ke zvýšení příjmu n-6 PUFA následoval po zjištění, že n-6 PUFA snižují efektivně hladinu cholesterolu²⁶⁸, a tak se dietní doporučení zabývala hlavně zvýšením zastoupení n-6 PUFA na úkor SFA v dietě²⁶⁹. V současné době je energetický přísun n-6 PUFA snad nejvyšší v průběhu celé fylogeneze rodu *Homo*, dokonce je nutné poměr n-6/n-3 PUFA upravit na poměr 5-3:1 z dnešního poměru 16-10:1 typického pro jídelníček euroamerického typu²⁶⁶. Nová dietní doporučení jsou si už příznivých účinků n-3 PUFA vědoma²⁷⁰, dokonce se objevují nové komerčně použitelné zdroje n-3 PUFA, ať už jsou to obohacené živočišné produkty²⁷¹ nebo výsledky genetických manipulací s rostlinami²⁷². Cílem je dosáhnout odpovídajícího dietního příjmu n-3 PUFA, který se pohybuje v rozmezí 0,4-1,0 g/den pro dospělé a až 2,2 g/den pro kojící matky²⁷³.

Příznivé účinky n-3 PUFA

Obě skupiny PUFA, n-6 i n-3, vzájemně kompetují na úrovni vlastní biosynthesy, biosynthesy eikosanoidů i vazby na receptory pro eikosanoidy. Příznivé účinky eikosanoidů

odvozených od n-3 PUFA jsou zčásti způsobeny kompetičními mechanismy a zčásti odlišnými vlastnostmi eikosanoidů odvozených od PUFA n-3^{266,274}. Podávání n-3 PUFA tedy příznivě ovlivní řadu procesů, které jsou pod kontrolou eikosanoidů, např. imunitní, zánětlivé odpovědi i reologické vlastnosti krve (agregabilita krevních destiček atp.).

Příznivý vliv podávání PUFA n-3 na hladinu TAG v plasmě²⁷⁵ je způsoben inhibicí tvorby částic VLDL v játrech a následnou podporou jejich konverze na LDL částice²¹⁶. Podpora oxidace mastných kyselin, inhibice uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) z depotního tuku a snížení zastoupení malých densních částí LDL jsou další příznivé účinky n-3 PUFA na lipidový metabolismus²⁷⁶. S výhodou lze dietní intervenci použít za různých patofysiologických stavů spojených s poruchami lipidového metabolismu, jako metabolického syndromu, těžších forem dyslipidemií a pro prevenci ICHS.

Poruchy sestavování peroxisomů (Zellwegerův syndrom, novorozenecká adrenoleukodystrofie, infantilní forma Refsumovy choroby) mají obvykle za následek poruchy vývoje centrálního nervového systému se sníženým zastoupením n-3 PUFA v mozku. Podávání izolovaných ethylesterů DHA od dětství vede ke klinické a laboratorní úpravě nepříznivého stavu nemocných²⁷⁷. Autické děti mívají nižší zastoupení DHA v plasmě než jejich mentálně retardovaní vrstevníci²⁷⁸, a proto bylo navrženo zvýšení přísunu PUFA v dietě pro tyto děti.

Komerčně chráněné použití n-3 PUFA

U mnoha patologických stavů je suplementace pomocí n-3 PUFA předmětem patentové ochrany, například i u mentální anorexie²⁷⁹. PUFA n-3 jsou už v některých státech (USA, Rakousko) registrovány pro léčbu dyslipidemie, u nás jen jako dietní doplněk (potravina určená pro zvláštní výživu).

1.4.2 PREKURSORY CHOLESTEROLU A JEJICH PATOFYSIOLOGICKÝ VÝZNAM

Stanovení koncentrací prekursorů cholesterolu v klinické praxi není běžně prováděno. Tato skupina sterolů dosahuje o dva až tři řády nižších hodnot, než jsou koncentrace cholesterolu, a jejich stanovení tak vyžaduje plynovou (kapalinovou) chromatografii (GC, HPLC) spojenou případně s hmotnostní spektrometrií (MS). Změněné hladiny prekursorů cholesterolu jsou výsledkem modulace úrovně biosynthesy cholesterolu nebo přímo její inhibice, například v důsledku genetických defektů.

1.4.2.1 Inhibice biosynthesy cholesterolu

Biosynthetická dráha obsahuje mnohé enzymy, jejichž nedostatečná nebo chybějící aktivita vede k zablokování syntesy cholesterolu a k hromadění příslušných meziproductů²⁸⁰. Aktivita jednotlivých enzymů jsou regulovány především na úrovni zpětnovazebných inhibic produkty, u HMG-CoA reductasy jako rychlost limitujícího kroku celé dráhy se uplatňují i jiné motivy, jako bicyklická fosforylační/defosforylační kaskáda, inhibice nesteroidním mevalonolaktonem atd.²⁸¹. Z patobiochemického hlediska jsou však zajímavé i inhibitory organismu nevlastní: přírodní látky nebo syntetické sloučeniny, jako např. statiny²⁸², některé progestiny²⁸³ a ketokonazol²⁸⁴.

Dědičné defekty biosynthesy cholesterolu

Dědičné defekty byly zatím zaznamenány u sedmi z devíti enzymů v postskvalenové biosynthetické dráze cholesterolu²⁸⁵. Až na lehčí případy Smithova-Lemliho-Oppitzova syndromu (SLOS) se jedná o defekty neslučitelné se životem, postižení jedinci umírají většinou postnatálně nebo dokonce prenatálně. V organismu se akumulují substráty defektních enzymů, popřípadě i meziproducty předcházející inhibovanému kroku.

Iatrogenní příčiny

Jeden z prvních *synthetických inhibitorů biosynthesy cholesterolu*, triparanol, je inhibitor DHCR24 a inhibuje redukci dvojnásobné vazby v postranním řetězci desmosterolu za vzniku cholesterolu. Bohužel po slibných počátcích musel výrobce stáhnout tuto látku z trhu (duben 1962), protože se objevily vážné vedlejší účinky – oční katarakta²⁸⁶. Blokování přeměny desmosterolu na cholesterol vedlo k hromadění desmosterolu ve tkáních a jeho metabolisaci, např. i na žlučové kyseliny a steroidní hormony²⁸⁷.

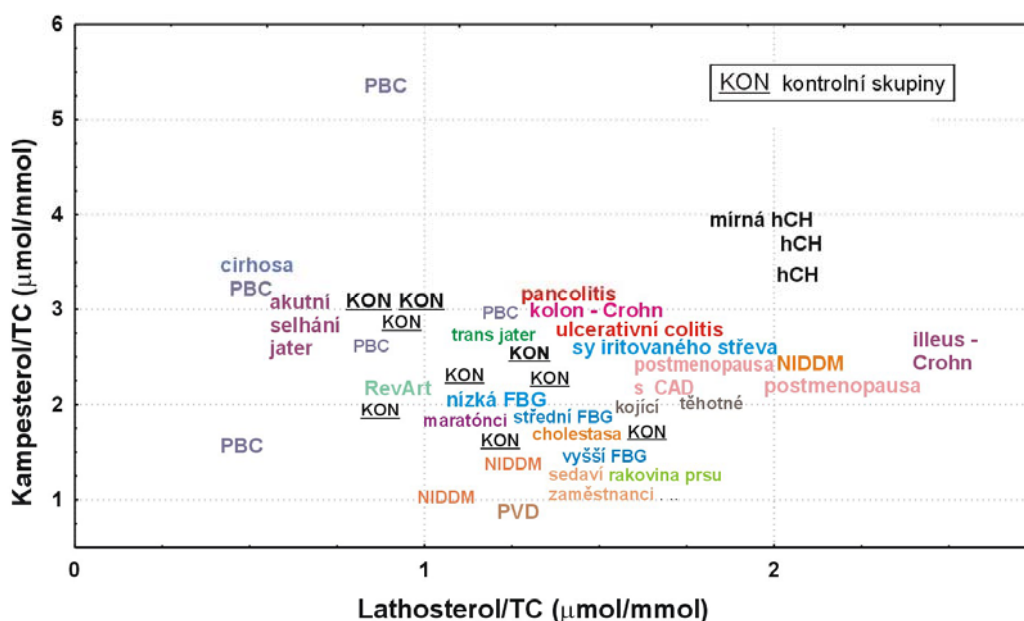
Přírodní látky interferující s biosynthesou cholesterolu zahrnují široké spektrum sloučenin od kyanidů až po fytosteroly. Za zmínku stojí z dietních zdrojů účinné látky z extraktů česneku a některé fytosteroly. Otázka hypocholesterolemického účinku *extraktů česneku* není dodnes dořešena; je známo, že některé složky inhibují steroidní 4-demethylasu (steroidní C4

methyloxidasu), v kulturách hepatocytů se hromadily FF-MAS a metabolit T-MAS²⁸⁸, ale nebyl pozorován vliv na hladinu lathosterolu v seru²⁸⁹. Stigmasterol, nejběžnější zástupce fytosterolů s dvojnou vazbou na C22, které jsou inhibitory DHCR24, je z diety absorbován cca s 2 - 5% účinností¹⁵⁸, a hladina nutná k inhibici a hladina v plasmě je podobná²¹⁶.

1.4.2.2 Změna úrovně biosynthesy cholesterolu

Z prekursorů cholesterolu se v lidské plasmě vyskytuje v nejvyšší koncentraci lathosterol, desmosterol dosahuje nižších hodnot a ostatní prekursory jsou přítomny za fyziologických podmínek ve zlomkových koncentracích v porovnání s lathosterolem⁸⁶. Pro účely popsání patofyziologického metabolismu prekursorů cholesterolu bude dále věnována pozornost lathosterolu. Obrázek 1.4.2.1 shrnuje některé studie^{87,88,90,93,96,192,290-300}, které odhadovaly syntézu cholesterolu pomocí stanovení lathosterolu a absorpci cholesterolu pomocí hladiny kampesterolu v plasmě. Stanovované necholesterolové steroly jsou vztaženy ke koncentraci celkového cholesterolu.

Obr. 1.4.2.1 Vztah hladin lathosterolu a kampesterolu



PBC - primární biliární cirhosa, hCH - hypercholesterolemie, RevArt - revmatoidní artritida, PVD - vaskulární choroba končetin, FBG - glykemie nalačno, NIDDM - diabetes mellitus 2. typu; podle (citace viz text)

Nejvyšší koncentrace prekursorů cholesterolu jsou obvykle v noci (0:00 - 4:00); ale protože u pacientů s fenotypickou abetalipoproteinemií, kteří nejsou schopni syntetizovat chylomikrony, byl též pozorován obdobný diurnální rytmus, nelze zvýšené hladiny připisovat sníženému vychytávání chylomikronů játry³⁰¹. Na rozdíl od syntézy mastných kyselin se neuplatňuje u žen fáze menstruačního cyklu³⁰².

Mentální anorexie

U mentální anorexie jsou koncentrace cholesterolu lehce nebo výrazně zvýšené, ale to není způsobeno vyšší syntésou cholesterolu *de novo* (hladina lathosterolu je spíše nižší)³⁰³. Částice LDL jsou bohatší na cholesterol i TAG, jsou pomaleji odbourávány, což je zřejmě důsledkem ztráty tělesného tuku a tedy změn v hladinách thyroidních hormonů, nižší syntézy cholesterolu a zvýšené lipolysy³⁰⁴. Po realimentaci se zvýší vychytávání cholesterolu - sníží hladina apo B, zvýší hladina lathosterolu a sníží hladina cholesterolu³⁰⁵.

Enterohepatální metabolismus žlučových kyselin

Malabsorpce žlučových kyselin zvyšuje syntésu cholesterolu a TAG i počet receptorů pro LDL v játrech. U ileální dysfunkce je příjem žlučových kyselin ze střeva snížen a zvyšuje se syntésa cholesterolu. Lathosterol je za těchto podmínek vhodný indikátor ztrát žlučových kyselin do faeces³⁰⁶. Zvýšená syntésa žlučových kyselin a cholesterolu (zvýšená hladina lathosterolu) předchází tvorbě žlučových kamenů, zřejmě díky zvýšeným ztrátám žlučových kyselin ve střevě³⁰⁷. Lathosterol je ve žlučových kamenech s převahou cholesterolu méně zastoupen než ve žlučových kamenech pigmentového typu³⁰⁸.

Metabolismus lipoproteinů

Mezi sekreční rychlostí VLDL, apo B a plasmatickou hladinou lathosterolu i poměru lathosterol/cholesterol existuje pozitivní korelace. Toto zjištění podporuje představu o regulaci jaterní sekrece apo B hladinou cholesterolového substrátu³⁰⁹. Syntésa VLDL-1 a VLDL-2 je zřejmě regulována nezávisle, protože poměr lathosterol/cholesterol koreluje dobře pouze s hladinou apo B-100 částic VLDL-2³¹⁰.

Dietní vlivy

U Japonců ve srovnání se severní Evropou je hladina lathosterolu v plasmě vyšší (tedy vyšší je i biosyntésa cholesterolu pro jeho nižší příjem z potravy), je zde i nižší incidence některých typů rakoviny. Tento efekt se také projevuje i u vegetariánů, středomořské diety, těhotenství a laktace³¹¹. Nahrazení PUFA za SFA v dietě pro mírně hypercholesterolemické pacienty snižuje plasmatický lathosterol (syntésu cholesterolu). Tento pokles byl signifikantní u mužů, ale ne u žen. U obou pohlaví došlo k poklesu celkového cholesterolu (TC), LDL-C i HDL-C³¹². Hladina lathosterolu se zvyšuje po podávání nízkotučné diety obohacené o slunečnicový nebo řepkový olej²⁹⁶. Suplementace DHA v dávce 0,7 g/den hladinu lathosterolu neovlivnila³¹³. Významně se zvýšila hladina LDL-cholesterolu, zřejmě díky *down-regulaci* LDL-receptoru.

Obesita a diabetes

U obesních mužů je plasmatická koncentrace lathosterolu vyšší (vyšší syntéza cholesterolu), vyšší je i sekrece VLDL a apo B-100³¹⁴. Absorpce cholesterolu je u mírně hypercholesterolemických pacientů s NIDDM nižší (nižší koncentrace fytoosterolů), kdežto syntéza cholesterolu je zvýšená (vyšší poměr lathosterol/cholesterol)²⁹⁰, přičemž vlastní diabetes má větší účinek než hmotnost³¹⁵. Po kontrolované dietě u obesních mužů klesá tělesná hmotnost i plasmatický lathosterol, TC, TAG i insulin. Játerní sekrece VLDL apo B poklesla zřejmě díky nižšímu portálnímu zásobení lipidy. Efekt na LDL apo B je nejistý³¹⁶. Akutní restrikce příjmu energie a fytoosterolů i cholesterolu u obesních má podobné účinky³¹⁷.

U nediabetických mužů s vyšší hladinou glukosy byla pozorována dlouhodobá závislost hladin glukosy s hladinami serových prekursorů cholesterolu. Nízká intestinální absorpce a vysoká syntéza cholesterolu je pro tyto osoby charakteristická²⁹⁷. Pacienti, kteří jsou nově léčeni insulinem, po krátké době vykazují stimulaci syntézy cholesterolu (vyšší poměr lathosterol/cholesterol) a dokonce jeho nadprodukcii³¹⁸. Protože zdraví normoglykemičtí jedinci mají hladinu insulinu nalačno korelující se syntésou cholesterolu (nezávisle na BMI nebo insulinem stimulovaným příjmem glukosy), je možné, že regulace syntézy cholesterolu vysokými hladinami insulinu je pojátkem mezi insulinovou resistencí a metabolismem cholesterolu³¹⁹.

Pacienti s insulin dependentním DM mají vyšší absorpci sterolů a nižší syntézu cholesterolu v porovnání s NIDDM³²⁰.

Fenotyp apoE

Fenotyp apo E ovlivňuje hladinu lathosterolu u dětí: je vyšší u fenotypu E3/3 nebo E3/2, zatímco u E3/4 jsou vyšší hladiny rostlinných sterolů⁸⁷. Vliv fenotypu apo E na účinek hypocholesterolemické diety estery β -sitostanolu je pro alelu $\epsilon 4$ největší – koncentrace TC i LDL-C jsou sníženy, koncentrace prekursorů cholesterolu zvýšené, došlo tedy ke snížené absorpci cholesterolu u osob, které mají díky přítomnosti $\epsilon 4$ alely absorpci cholesterolu již basálně zvýšenou³⁰⁰. Novější studie tento názor zcela nepodporují³²¹, u dětí s genotypem apoE 4/4 byly nalezeny podobné hladiny prekursorů cholesterolu jako u dětí s genotypem 3/3.

Poruchy funkce gastrointestinálního systému

Změněné koncentrace necholesterolových sterolů v plasmě byly pozorovány u idiopatických střevních zánětů s postižením terminálního ilea (pankolitida, ileální a kolonická Crohnova choroba), u kterých dochází ke zvýšení koncentrace serového cholestanolu hlavně díky jeho zhoršené biliární eliminaci²⁹¹. Mírná dysfunkce terminálního ilea vede

k malabsorpci žlučových kyselin a ke zvýšení biosynthesy cholesterolu. Hodnoty plasmatického lathosterolu byly použity k detekci malabsorpce žluči u pacientů s ileální resekci střeva (Crohnův syndrom)³²².

Ischemická choroba srdeční

Zvýšené hladiny serového skvalenu, kampesterolu a β -sitosterolu a nízká hladina lathosterolu byly spojeny se zvýšeným rizikem této choroby u žen²⁹⁵, u mužů nebyla nízká hladina lathosterolu prokázána^{323,324}.

Primární hypertriacylglycerolemie

U asi jedné třetiny nediabetických hypertriacylglycerolemiků je zvýšena hladina lathosterolu v seru⁹⁷. To by mohlo ukazovat na zvýšenou syntesu cholesterolu spolu se zvýšenou produkcí VLDL částic, což je zřejmě výsledek chronické hyperinsulinemie, která aktivuje transkripční faktor SREBP-1c³²⁵.

Tkáňové poškození

Pacienti s mnohočetnými poraněními mívají sníženou hladinu cholesterolu způsobenou jeho sníženou syntesou, neboť mají sníženou hladinu lathosterolu³²⁶. Změny v plasmatickém profilu lipidů po akutním infarktu myokardu jsou spojeny s podstatným zvýšením syntesy cholesterolu. Autoři pozorovali o jednu čtvrtinu zvýšený poměr lathosterol/cholesterol v průběhu prvních dvou dnů po infarktu, po deseti dnech se tento poměr vrátil na normální hladiny včetně lipidového profilu. Tyto změny zřejmě odrážejí reparační procesy v srdeční tkáni po atace³²⁷.

1.4.3 FYTOSTEROLY ZA PATOFYSIOLOGICKÝCH STAVŮ

Sitosterolemie

Sitosterolemie (MIM 210250), vzácné autosomálně recesivně dědičné onemocnění, je způsobena mutacemi v genech kódujících transportní molekuly ABCG5 a ABCG8¹⁵⁶. Pacienti mají zvýšenou střevní absorpci fytoosterolů a sníženou exkreci do žluče, což má za následek až 50 násobné zvýšení hladin kampesterolu a β -sitosterolu v plasmě a také ve tkáních. Cholesterol je absorbován rovněž ve zvýšené míře a plasmatické hladiny jsou vyšší. Pacienti jsou už v mládí postiženi ICHS³²⁸.

V mozkové tkáni dosahoval podíl fytoosterolů necelého procenta pro β -sitosterol a kampesterol³²⁹. Pokročilé analytické techniky snižující mez stanovitelnosti minoritních sterolů dovolily bližší zkoumání akumulace fytoosterolů v nervové tkáni a Jansen³³⁰ prokázal u myši s deficientním ABCG5/G8 transporterem akumulaci fytoosterolů v mozku a dokonce zvýšené hladiny kampesterolu u kontrolní skupiny po zvýšeném dietním přísunu fytoosterolů. Obecně přijímaná these o neprostupnosti hematoencefalické bariéry pro molekuly sterolů je tak ohrožena.

Pokud se sitosterolemickému pacientovi transplantují játra, dojde k normalisaci hladin fytoosterolů, což znamená, že v metabolismu fytoosterolů hrají hlavní roli játra a nikoliv střevo, kde se fytoosteroly vstřebávají³³¹.

Hladiny fytoosterolů za různých patofysiologických stavů

U pacientů trpících diabetem 2. typu (NIDDM) jsou snížené hladiny fytoosterolů způsobeny jejich redukováným příjmem²⁹⁹ nebo pravděpodobněji rychlejší utlisací lipoproteinových částic pocházejících z diety⁹⁰. Obesní pacienti (s BMI vyšším než 31) mají snížené hladiny fytoosterolů v seru i ve žluči, zřejmě díky nižší účinnosti absorpce cholesterolu⁹². Nízká absorpce cholesterolu a tedy i fytoosterolů byla v některých studiích spojena s charakteristikou metabolického syndromu (vysoké hodnoty BMI, plasmatické glukosy, insulinu, TAG a prekursorů biosynthesy cholesterolu)³³². Restrikce energie a příjmu fytoosterolů (a cholesterolu) u obesních pacientů (s NIDDM) vede ke zhoršenému obratu fytoosterolů (hladina cholestanolu jako markeru absorpce je zvýšena, ale hladiny kampesterolu a β -sitosterolu jsou sníženy) spojenému s mobilisací z tukové tkáně³¹⁵. Diabetes mellitus prvního typu byl spojen s opačným efektem absorpce než NIDDM – vysokou absorpcí a nízkou syntésou cholesterolu³²⁰.

U *celiakie* je sice absorpční účinnost nižší, ale díky zvýšené sekreci žlučových kyselin se

v absolutním měřítku absorpce cholesterolu zachovává na fyziologické úrovni³³³. Atrofie klků proximální části tenkého střeva za těchto stavů vede k poklesu hladin fytosterolů v plasmě, přičemž kampesterol je ovlivněn více, zřejmě díky vyřazení části střeva, kde je nejvíce absorbován¹⁷⁷.

Vegetariáni mají zvýšenou clearanci fytosterolů z plasmy a zvýšenou sekreci fytosterolů do žluče⁹⁵. Po převedení pacientů s revmatoidní artritidou na veganskou dietu došlo ke zvýšení koncentrací β -sitosterolu a ke snížení koncentrací kampesterolu. Rozdílný efekt diety možná souvisel s rozdílným vlivem diety na relativní absorpční účinnost kampesterolu a β -sitosterolu nebo změnami v clearanci fytosterolů z plasmy^{95,96}. Suplementace DHA v dávce 0,7 g/den hladinu fytosterolů neovlivnila³¹³.

Plasmatické koncentrace kampesterolu a β -sitosterolu jsou i u *pacientů s ICHS*, kteří netrpí fytosterolemií, dalším rizikovým faktorem pro ICHS nezávislým na hladinách celkového a LDL cholesterolu i lathosterolu³²³. Hodnoty β -sitosterolu vyšší než 5,25 $\mu\text{mol/l}$ byly u mužů ve studii PROCAM spojeny s vyšším rizikem ICHS (poměr risik 1,81; $P < 0,05$). Protože tato studie proběhla před uvedením statinů na trh, nejsou tyto výsledky ovlivněny hypolipidemickou léčbou³²⁴. Mírná hypercholesterolemie bez zvýšené synthesy cholesterolu svědčí spolu s vyššími hodnotami fytosterolů pro zvýšenou absorpci cholesterolu.

U *familiární hypercholesterolemie* jsou markery absorpce a synthesy cholesterolu v negativní korelaci³³⁴, což znamená, že i za zvýšené koncentrace cholesterolu v plasmě je ustanovena jeho homeostasa. Po intervenci statiny se synthesa cholesterolu snižuje a absorpce zvyšuje. Zvýšení absorpce je nejvyšší u jedinců, kteří mají i bez intervence největší absorpční schopnost³³⁵.

1.5 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE MASTNÝCH KYSELIN A STEROLŮ

1.5.1 Analýza mastných kyselin

Plynová chromatografie mastných kyselin má více než půl století dlouhou tradici v analýze nederivatisovaných mastných kyselin³³⁶ a jejich methylesterů³³⁷. Derivatisace na methylestery zůstala podnes nejvýhodnější formou přípravy vzorku pro analýsu pomocí kapilární GC. Technologický pokrok za poslední půlstoletí znamenal rozvoj sofistikovaných instrumentačních technik, které minimalisovaly ztráty vzorku během chromatografického procesu a chyby vzniklé z měření ploch peaků. Praktické požadavky vedly k širokému rozšíření techniky nástřiku „hot split/splitless“ a detekce plamenoionizačním detektorem (FID). Optimalisace pracovních podmínek FID rozšiřuje oblast lineární odpovědi detektoru a dává též lepší kvantitativní výsledky³³⁸. Teplotní programování zaručuje dosažení podobných tvarů peaků pro všechny stanovované komponenty, což je problematické za isothermálních podmínek analýsy³³⁹. Pokud je systém správně nastaven, můžeme se spolehnout na teoretické odezvové faktory³⁴⁰, což bylo prokázáno i jinými autory^{341,342}, spíše než na korekční odezvové faktory³³⁸.

Kapilární kolony s chemicky zakotvenou středně polární stacionární fází jsou stále nejpoužívanější pro analýsu mastných kyselin v biologických vzorcích (kolony o vysoké polaritě jsou vhodné pro separaci *cis* a *trans* isomerů). Pořadí eluce v první řadě odráží počet uhlíkových atomů a teprve poté míru nenasycenosti řetězce (methylestery C_x mastných kyselin a čtyřmi nebo pěti dvojnými vazbami jsou eluovány před nasyceným esterem C_x+2 mastné kyseliny), kyselina stearidonová (18:4n-3) je eluována před kyselinou arachovou (20:0), EPA (20:5n-3) před kyselinou behenovou (22:0) a dokosapentaenová kyselina (22:5n-3) předchází kyselině lignocerové (24:0). DHA (22:6n-3) je eluována mezi tetrakosanovou (24:0) a nervonovou (24:1n-9) kyselinou s rozlišením na základní linii. C_n vícenenasycené mastné kyseliny řady n-6 jsou eluovány před svými analogy z řady n-3 o stejném počtu dvojných vazeb³⁴³.

Kvantitativní analýza pomocí plynové chromatografie s FID detekcí je založena na vztahu mezi hmotou „efektivních uhlíkových atomů“ (uhlíky methylenových skupin, pro methylestery mastných kyselin jsou to všechny atomy uhlíku vyjma uhlíku karboxylu) a odezvou detektoru. Vlastní analýza množství mastné kyseliny je tak postavena na porovnání plochy peaku A_i s plochou peaku vhodného vnitřního standardu A_{is} (to je obvykle C_x nasycená mastná kyselina o lichém x, jež není přítomna v matrici). Pro tyto účely byly použity kyselina margarová (17:0)^{341,342,344,345}, nonadekanová (19:0)^{343,346,347}, v případě vzorků obsahujících vysoké zastoupení vícenenasycených mastných kyselin také kyseliny

dokosatrienová (22:3n-3)^{348,349}, trikosanová (23:0) a nervonová (24:1n-9)³⁵⁰. Relativní směrodatná odchylka je úměrná rozdílu v počtu uhlíků určované složky a vnitřního standardu, kompenzace může být dosaženo použitím několika vnitřních standardů^{342,351}. Výsledky analýs mastných kyselin jsou obvykle uváděny v molárních procentech; zřídka se setkáme s absolutními koncentracemi vztaženými na objem plasmy anebo separovaných lipoproteinů^{347,348}.

1.5.2 Analýsa sterolů

Analýsa sterolů se v převážné míře spoléhá na chromatografické techniky spojené s dalšími separačními metodami. Protože na skelet sterolu se může připojit řetězec mastné kyseliny (steryl ester), sulfátu (steryl sulfát) i sacharidu (steryl glykosid), další analytický postup je řízen požadavkem stanovení buď celé molekuly, nebo pouze části sterolové. V klinické praxi se nejčastěji setkáváme s požadavkem stanovení pouze neesterifikovaného sterolu. Ačkoliv se molekuly sterolů od sebe často neliší v molekulové hmotnosti, možnosti umístění dvojných vazeb, prostorových konfigurací cyklů a připojení uhlovodíkových zbytků poskytují mnoho kombinací a činí analýsu sterolů stejně, ne-li zajímavější, než analýsu mastných kyselin. V lidské plasmě je dominujícím steroidem cholesterol, ostatní steroly jsou přítomny v maximálně o dva řády nižších koncentracích (nepočítaje v to vzácné dědičné choroby), navíc této koncentrace dosahuje jen několik sterolů.

Nejčastěji se můžeme setkat s analýsou necholesterolových sterolů pomocí GC, detekční mechanismy jsou založeny na FID³⁵² nebo na MS³⁵³, vysokoúčinná kapalinová chromatografie se používá ve spojení s různými detekčními technikami – detekce rozptylu světla na pevných částicích, MS, i UV detekce³⁵⁴. Některé práce se opírají o separaci a derivatisaci sterolů ze vzorku pomocí mikroextrakce na tuhé fázi a poté následuje obvyklá kapilární chromatografie³⁵⁵. Bez detekce pomocí MS se musí analytický chemik spoléhat na hodnoty retenčních časů (resp. relativních retenčních časů, RRT). Teoretické studie týkající se korelace struktury sterolu a RRT se opíraly o zavedení tzv. steroidového čísla v šedesátých letech minulého století³⁵⁶, praktického použití ale nenalezly. Vhodná volba polarity stacionární fáze a dalších parametrů analýsy tak zůstává otázkou řešenou postupně při zavádění metody, například na polární kapilární koloně jsou saturované 5 α steroly eluovány za 5 β analogy a při vhodné délce kolony a teplotním programu lze docílit toho, že nedojde k překrytí těchto peaků s žádným nenasyceným homologem o nižší molekulové hmotnosti³⁵⁷.

CÍL DISERTACE

Cílem této disertační práce bylo:

1. Upravit metodické postupy pro stanovení necholesterolových sterolů i mastných kyselin v lidské plasmě pomocí plynové kapilární chromatografie.
2. Na základě informací, které byly získány analysami necholesterolových sterolů i mastných kyselin spolu s dalšími biochemickými analysami, navrhnout u vybraných chorobných stavů možné patofysiologické mechanismy související se vzájemnými metabolickými vztahy cholesterolu a mastných kyselin.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Použité chemikálie

Rozpouštědla

Hexan, heptan, dichlormethan, chloroform, isooktan, acetanhydrid, methanol, diethylether a isopropylalkohol čistoty p.a. byly zakoupeny u firmy Chromservis (Chromservis, Praha, ČR), podrobeny kontrole na příměsi interferující se stanovením methylesterů mastných kyselin a stanovením volných a acetylovaných derivátů sterolů, a v případě potřeby byly predestilovány.

Chemikálie (KOH, I₂, Na, 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluen, NaCl, NaN₃, *N,N*-dimethylaminopyridin) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO, U.S.A.), CH₃COOH, Na₂SO₄, H₂SO₄, NH₃, HCOOH od od firmy Chromservis (Chromservis, Praha, ČR), Na₂EDTA a NaBr od firmy Fluka Chemika (Buchs, Švýcarsko).

N,N-dimethylaminopyridin byl rozpuštěn v chloroformu na koncentraci 6 mg/ml (derivatisační roztok pro acylaci necholesterolových sterolů).

Roztok pro dialysu byl připraven z 8,95 g NaCl, 0,05 g NaN₃, 3,7 mg Na₂EDTA, které byly doplněny do 1 l deionisovanou vodou.

Voda značky Dobrá voda (HSBW a.s., České Budějovice, ČR) byla zakoupena v komerčních řetězcích a podrobena kontrole na příměsi interferující se stanovením methylesterů mastných kyselin a sterolů.

Plyny pro chromatografii H₂, O₂/N₂ (20/80 v/v), N₂ čistoty > 99,999 (obj.%) byly odebírány od firmy Linde Technoplyn, a.s. (Praha, ČR)

2.2 Kalibrační standardy

Lipidové třídy

Standardy fosfolipidů, cholesterolu, 1-oktadekanolu (I.S._{LIP}) a monohexosidu ceramidu byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Co. Zásobní kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním látky ve směsi chloroform:methanol (2:1 v/v) na koncentrace 4 – 40 mg/ml podle jejich rozpustnosti ve směsi, I.S._{LIP} byl rozpuštěn ve směsi chloroform:methanol (2:1 v/v) na koncentraci 2 mg/ml. Ze zásobních roztoků bylo připraveno 6 kalibračních směsí, které byly po odpaření rozpuštěny v roztoku I.S._{LIP} a které pokrývaly rozpětí c(i):c(I.S._{LIP}) od 0,05 do 3,33.

Mastné kyseliny

Standardy methylesterů mastných kyselin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Co., 1,2-dinonadekanoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (I.S._{PL}), cholesteryl nonadekanoát (I.S._{CE}) a

trinonadekanoin (I.S._{TAG}) od firmy Larodane (Malmö, Sweden). Zásobní kalibrační roztoky methylesterů nasycených mastných kyselin (10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0 a 19:0 (vnitřní standard) a také roztok I.S._{PL} byl připraveny o koncentraci 10 mg/ml. Z ekvimolární směsi methylesterů a vnitřního standardu bylo připraveno devět roztoků pokrývajících poměr koncentrací $c(i):c(I.S._{PL})$ od 0,01 do 10. Výsledné roztoky byly analysovány neředěné (D0), ředěné 1:10 (D1) a 1:20 (D2).

Necholesterolové steroly

Standardy volných sterolů byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Co. Zásobní kalibrační roztoky o koncentraci 10 mg/ml byly připraveny rozpuštěním sterolů ve směsi heptan/chloroform (500/1 v/v). Jako vnitřní standard byl použit epikoprostanol (I.S._{NCHS}). Zásobní roztoky volných sterolů byly nejprve smíchány s I.S._{NCHS} a poté doplněny heptanem na konstantní objem tak, aby kalibrační křivka měla osm bodů pokrývajících rozpětí $c(i):c(I.S._{NCHS})$ od 0,0625 do 2,00. Kalibrační směs acetylovaných derivátů byla připravena acetylační kalibrační směsí volných sterolů (kapitola 2.6.4.2).

Cholesterol

Cholesterol a 5 α -cholestan (I.S._{CH}) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Co. Zásobní kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním ve směsi isooktan/chloroform (4/1 v/v) na koncentraci 20 mg/ml. Zásobní roztok cholesterolu byl smíchán s I.S._{CH}, vysušen a poté rozpuštěn v derivatisačním roztoku (viz kapitola 2.1). Poměry zásobního roztoku a roztoku I.S._{CH} byly voleny tak, aby kalibrační křivka měla 11 bodů pokrývajících rozpětí $c(i):c(I.S._{CH})$ od 0,10 do 3,00. Kalibrační směsi byly poté převedeny na acetáty (kapitola 2.6.4.2). Produkt byl odpařen, rozpuštěn v 200 μ l isooktanu a nastříkovan v objemu cca 1 μ l.

2.3 Přístrojové vybavení

Pro studie byly použity tyto přístroje:

analysátor Iatroscan (Iatroscan TH-10 TLC/FID Analyser, Iatron Laboratories, Tókjó, Japonsko)

analytické váhy (Sartorius, SRN)

automatický analyzátor Hitachi Model 717 (Hitachi, Tókjó, Japonsko)

centrifuga MLW K 23 D VEB (Centrifugebau, Engelsdorf, GDR, $r = 7$ cm)

homogenisátor Ultra-Turax T8 (Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, SRN)

plynové chromatografy:

Shimadzu GC-17 s automatickým injektorem AOC-20i (Shimadzu, Tókjó, Japonsko)

Chrompack modely CP-9000, CP-9001, 438A, 438S (Chrompack, Middelburg, Holandsko)

předvážky Nagema (OWA Labor, SRN)

pyknometr (Simax, ČR)

ultracentrifuga Beckman L8-55M, rotor 50.3 Ti (Beckman, U.S.A.)

2.4 Experimentální model

Pro experimentální studii byli zvoleni samci potkanů kmene Wistar, u kterých byly před zahájením studie stanoveny hladiny celkového cholesterolu a TAG v seru, podle kterých byli následně rozděleni do skupin tak, aby se tyto mezi sebou statisticky nelišily. Potkani byli umístěni po čtyřech ve standardisovaných klecích.

Potkanům byl podáván po dobu 6 týdnů dávce 0,1 mg vždy jeden z hypolipidemických léků - fenofibrát (LipanthylTM 200 M, Laboratoires Fournier, Dijon, France), fluvastatin (LescolTM, Sandoz Pharma Ltd., Basle, Switzerland), lovastatin (MevacorTM, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, U.S.A.) a pravastatin (LipostatTM, Bristol-Myers Squibb S.p.A., Anagni, Italy) v 0,5 ml PBS (w/v) jednou denně gastrickou sondou. Kontrolní skupina dostávala placebo (0,5 ml PBS). Potkani měli *ad libitum* přístup k dietě DOS 2BSt (Velaz, ČR) a ke zdroji vody. Po dobu studie byly zachovávány standardní podmínky chovu (teplota místnosti 22 ± 1 °C, relativní vlhkost 65 ± 5 %, cyklus světla 12 h/den). Poslední den po nočním lačnění byla zvířata anesthetisována thiopentalem (Spofa, ČR, 60 mg/kg, *i.p.*) a usmrcena. Venosní krev (s 1 mg/ml EDTA) byla odebrána z *vena cava inferior* a poté centrifugována při 300 g po 10 min. Mozky byly opatrně separovány, omyty ve fyziologickém roztoku, zlyofilisovány a uskladněny do dalších analys při -60 °C.

2.5 Klinické soubory

Antropometrická měření - tělesná hmotnost, výška, obvod pasu, boků, obvod svalstva paže a tloušťky čtyř kožních řas (SFT, skinfold thickness) - byla u všech osob měřena standardním způsobem³⁵⁸. Procento tělesného tuku bylo vypočteno z logaritmu součtu čtyř kožních řas (SFT, biceps, triceps, subscapularis, suprailiaca) a pomocí predikční rovnice specifické pro věk. Hmotnost tuku byla vypočtena jako součin procenta tělesného tuku a tělesné hmotnosti³⁵⁹.

Skupina s mentální anorexií (AN) sestávala z 18 žen a příslušná kontrolní skupina z 25 žen stejného věku. Pacientky byly sledovány v rámci psychologické a nutriční ambulance IV. interní kliniky. Pacientky ani kontrolní osoby neužívaly žádné léky, které by mohly ovlivnit metabolismus lipoproteinů (LP), ani žádné vitaminy, antioxidanty a potravní doplňky obohacené o n-3 a n-6 PUFA. Žádná ze sledovaných žen neužívala hormonální antikoncepci a jejich rodinná anamnesa byla negativní z hlediska výskytu předčasné ICHS i familiární hyperlipoproteinemie (HLP). Mentální anorexie byla diagnostikována na základě obecně přijatých kritérií³⁶⁰.

Skupina PEM zahrnovala 22 osob (12 mužů/10 žen), příslušná kontrolní skupina 35 zdravých jedinců (10 mužů/25 žen). Diagnostika PEM byla provedena podle obecně

přijímaných kritérií³⁶¹⁻³⁶³. Ve skupině nemocných bylo 5 osob s akutní pankreatitidou, 8 s malabsorpčním syndromem, 7 se sepsí a 2 se syndromem systémové zánětlivé odpovědi (SIRS). Jako vylučovací kritérium byl zvolen věk nad 70 let, generalisované nádorové onemocnění, těžší stupeň jaterní a renální insuficience, kardiální insuficience III a IV podle NYHA, léčba kortikoidy, imunosupresivy, cytostatiky, klinicky symptomatické endokrinopatie, APACHE skóre větší než devět³⁶⁴.

Vyšetřovaný soubor *obesních pacientů* byl tvořen 44 obesními osobami, účastníky projektu 5. rámcového programu EU NUGENOB (Nutrient Gene Interaction on Human Obesity r. 2001–2004), (věk $39,2 \pm 4,7$ let, hmotnost $104,9 \pm 5,1$ kg, BMI $34,6 \pm 4,8$ kg/m²), bez dalších metabolických komplikací obesity a medikace. Soubor byl randomisován do 2 skupin: 1. skupina s dietou s nízkým zastoupením tuků (LFD), 2. skupina s vysokým zastoupením tuků (HFD). Obesní osoby dodržovaly po dobu 10 týdnů nízkenergetický redukční režim o různém obsahu tuků bez současného ovlivnění energetického výdeje zvýšenou pohybovou aktivitou. Obě diety byly navrženy tak, aby poskytovaly o 600 kcal/den méně než odhadovaný celodenní energetický výdej. Tento byl odhadnut dle vzorce: klidový energetický výdej (hodnocen nepřímou kalorimetrií) x koef. 1,3³⁶⁵. Koeficientem 1,3 je do celkového výdeje zahrnuta předpokládaná energetická spotřeba související s denní pohybovou aktivitou. Dieta LFD obsahovala 20-25 % energetického obsahu tuku, dieta HFD 40-45 % energetického obsahu tuků.

Podkožní tuková tkáň byla odebrána z břicha 5-10 cm vpravo od pupku jehlovou biopsií po předchozí anesthesii 2% roztokem mesokainu³⁶⁶. Vzorky krevního sera a tukové tkáně byly do dalšího zpracování skladovány při -80 °C.

Skupina *hyperlipidemických pacientů* byla rekrutována z pacientů lipidové ambulance IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Pro zařazení do skupiny hyperlipoproteinemie platila kritéria uvedená v [Tab. 2.1](#).

Tabulka 2.1 Hraniční hodnoty pro normo- and hyperlipoproteinemii

		TC (mmol/l)	TAG (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	VLDL-TAG (mmol/l)
NLP	NLP	< 5,2	< 2,3	< 4,1	< 2,0
HC	HLP	> 6,8	< 2,3	> 4,2	< 2,0
HTAG		< 6,2	> 2,3	< 4,1	> 2,0
MHLP		> 6,8	2,3-5,0	> 4,2	> 2,0

HC – hypercholesterolemie, HTAG – hypertriacylglycerolemie, MHLP – smíšená hyperlipoproteinemie, NLP – normolipidemie, HLP - hyperlipoproteinemie

Jedinci byli do *kontrolních skupin* získáváni ze zaměstnanců IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, jejich rodinných příslušníků a dalších dobrovolníků.

Všichni účastníci všech studií obdrželi poučení o příslušné studii a podepsali před zahájením studie informovaný souhlas. Všechny studie byly schváleny příslušnými etickými komisemi (Etické komise 1. a 3. lékařské fakulty University Karlovy, Etické komise VFN v Praze), popřípadě probíhaly v souladu s platnými předpisy pro práci se zvířaty.

2.6 Analytické metody

2.6.1 Rutinní biochemické analýsy

Žilní krev byla odebírána mezi 7. a 8. hodinou ranní po předchozím 12 hodinovém lačnění. Vzorky krve, obsahující 1 mg/ml EDTA, byly ihned po odběru ochlazeny na 4 – 6 °C, plasma separována do 30 min za stejné teploty při 1000 g x 10 min. Vzorky pro rutinní biochemické a hematologické analýsy byly zpracovány ihned, pro další analýsy byly skladovány při -70 °C.

Koncentrace plasmatického TC, TAG a PL byly měřeny enzymaticko-kolorimetrickou metodou (Boehringer, Mannheim SRN), koncentrace HDL-C byla stanovena v supernatantu po srážení LP B s kyselinou fosfowolframovou a Mg^{2+} s použitím setu stejného výrobce. Koncentrace LDL-C byly vypočteny pomocí β -kvantifikace, podle vzorce $LDL-C = TC - TAG/2,2 - HDL-C^{367}$. Hladiny NEFA byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickou metodou (NEFA, Randox Labs, Velká Británie). Koncentrace apo byly měřeny Laurellovou raketovou elektroforesou s použitím standardů a specifických protilátek proti apo A-I, apo B (Behring Werke AG, Marburg, SRN) a proti Lp[a] (Immuno AG, Vídeň, Rakousko).

Rutinní laboratorní testy (glukosa, celková bílkovina, albumin, prealbumin, kreatinin, urea, kyselina močová, cholinesterasa, bilirubin, ALT, AST, GGT) byly provedeny pomocí komerčních reagenčních setů na automatickém analyzátoru Hitachi Model 717 (Hitachi, Tókjó, Japonsko).

2.6.2 Ultracentrifugační separace lipoproteinů

Lipoproteiny LDL a VLDL byly separovány pomocí sekvenční preparativní ultracentrifugace v isopyklickém prostředí³⁶⁸. Pokud byl vzorek plasmy chylosní, nejprve byla oddělena chylomikra ultracentrifugací. Ke 4 ml plasmy bylo opatrně po stěně zkumavky přidáno 0,5 ml H_2O a poté centrifugováno 30 min při 10 °C a 20×10^3 g. Flotující chylomikra byla odebrána Pasteurovou pipetou. Ve zkumavce zbyly 3 ml vzorku. Separace VLDL proběhla po přidání 1,5 ml roztoku o $d = 1,006$ g/ml a ultracentrifugací při 114×10^3 g po 16

hod při 10 °C. Flotující vrstva (1,5 ml) byla odebrána jako VLDL a pak bylo přidáno 1,5 ml roztoku o $d = 1,063 \text{ g/ml}$ a ultracentrifugováno při $114 \times 10^3 \text{ g}$ po 20 hod při 10 °C. Flotující vrstva (1,5 ml) byla odebrána jako LDL, ve zbylém objemu zůstaly HDL a VHDL částice. Vzorky lipoproteinů byly poté dialysovány po 24 hod ve tmě při 4 °C.

2.6.3 Extrakce a analýsy mozkových lipidů

Mozkové lipidy byly extrahovány metodou podle Folche³⁶⁹. Složení jednotlivých lipidových tříd bylo analysováno pomocí chromatografie na tenké vrstvě s plamenoionizační detekcí (TLC-FID), jako vnitřní standard byl použit 1-oktadekanol³⁷⁰. Vzorek se nejprve nanese na speciální křemenné tyčinky se zakotvenou silikagelovou fází a tyto tyčinky podstoupily vyvíjecí proces v mobilních fázích, po kterém byly jednotlivé tyčinky spáleny a produkty analysovány v poli TLC-FID detektoru. Rozdělení všech lipidových tříd si vyžádalo postupné vyvíjení s částečným spálením (od posice 1,0 cm výše) a detekci po prvním kroku s mobilní fází hexan/diethylether/kyselina mravenčí (45/15/0,3, v/v/v, 2 x 20 min) pro vyvíjení neutrálních lipidů, po kterém následovalo vyvíjení pomocí dvou mobilních fází chloroform/methanol/ethylacetát/voda/isopropylalkohol (20/6/12/4/17, v/v/v/v/v, 2 x 60 min) a chloroform/methanol/konc. amoniak (40/20/3, v/v/v, 2 x 30 min) pro následnou separaci fosfolipidů a monohexosidu ceramidu. Tyčinky byly poté spáleny a detekovány po celé délce.

Pro vyhodnocení záznamů bylo použito integračního programu CSW v.1.7 (Data Apex® Ltd., Praha) s nastavenými parametry: šířka peaku 0,01 min, práh integrace 0,1 mV, měřicí rozsah 1000 mV. Protože kalibrační závislosti nebyly lineární a lišily se pro každou tyčinku, pro kvantitativní vyhodnocení dat byl sestaven program v prostředí QBasic 4.5³⁷¹.

2.6.4 Chromatografické analýsy

2.6.4.1 Analýsy mastných kyselin

Pro analýsu mastných kyselin byl nejprve extrahován celkový lipid³⁶⁹ s použitím dichlormethanu místo chloroformu³⁷². Jednotlivé lipidové třídy - CE, TAG a PL byly separovány preparativní tenkovrstevnou chromatografií na silikagelu s mobilní fází heptan-diethylether-kyselina octová (80:20:3 v/v/v). Pokud bylo nutné z PL izolovat jednotlivé třídy, byly z materiálu vrstvy eluovány směsí dichlormethan-methanol (1:1 v/v) a zahuštěný vzorek nanesen na další desku a vyvíjen pomocí mobilní fáze chloroform-methanol-voda (60:30:5 v/v/v). Separované CE byly transesterifikovány na methylestery mastných kyselin (FAME, fatty acid methylesters) za přítomnosti materiálu vrstvy pomocí 1M methanolátu sodného po dobu 20 min při 80 °C v dusíkové atmosféře. Stejně byly transesterifikovány i TAG a PL za laboratorní teploty po dobu 60 min. Reakce byla ukončena neutralizační směsí 0,5N

kyselinou octovou, FAME extrahovány dvakrát hexanem a po vysušení skladovány v malém objemu isooktanu při -20 °C.

Analysy FAME z CE byly provedeny na kapilárním plynovém chromatografu CP 9001, vybaveném kapilárním split/splitless injektorem a plamenoionizačním detektorem. Pro analýsu byla použita křemenná kapilární kolona (25 m x 0,32 mm I.D.) s chemicky zakotvenou fází CP-FFAP (Chrompack). Teplota termostatu byla programována následovně: 80 °C, isothermicky 1 min, pak do 230 °C rychlostí 2 K/min, dále do 250 °C rychlostí 20 K/min, a isothermálně 45 min. Teplota injektoru byla 250 °C, detektoru 270 °C. Vstupní tlak nosného plynu (vodík) byl 80 kPa, typ nástřiku splitless po dobu 1 min.

Analysy FAME z TAG a PL byly provedeny za stejných chromatografických podmínek na přístroji GC-17 s kolonou o délce 25 m a vnitřním průměru 0,25 mm (I.D., internal diameter) s chemicky zakotvenou stacionární fází CP-WAX 52 CB. Konečná isothermická doba byla 15 min. Přístroj byl vybaven automatickým dávkovačem AOC-20i (Shimadzu).

Pokud bylo nutné stanovit v profilu mastných kyselin i *trans*-isomery mastných kyselin a CLA ([studie VIII, kapitola 3.3.3](#)), do plynového chromatografu byla nainstalována kolona CP-Sil 88 (Chrompack) o délce 100 m a vnitřním průměru 0,25 mm. Teplotní program termostatu byl z 80 °C rychlostí 2 K/min na teplotu 230 °C, pak isothermálně 45 min. Další podmínky byly obdobné.

2.6.4.2 Analýsy necholesterolových sterolů

Saponifikace

Pro analýsu sterolů byly vzorky sera (0,5 ml) obsahující jako vnitřní standard epikoprostanol o koncentraci 1 mg/dl zmýdelněny v 5 ml 5M KOH v methanolu po dobu 20 hod při 40 °C v dusíkové atmosféře v temnu. Po přidání 10 ml vody byl nezmýdelnitelný podíl extrahován 2x 2,5 ml hexanu, spojené extrakty vysušeny a do další analýsy skladovány v malém množství isooktanu při -20 °C. V této formě mohly být vzorky analysovány jako volné steroly.

Acetylace

Vzorky byly dále derivatisovány na acetáty: extrakt byl vysušen, bylo přidáno 1 ml roztoku *N,N*-dimethylaminopyridinu v chloroformu, 1 ml acetanhydridu a po 1 min byl reakční směsí probubláván dusík. Vzorek byl inkubován v temnu a pod atmosférou dusíku 24 h při laboratorní teplotě, poté byl 2x extrahován 5 ml dichlormethanu a spojené spodní vrstvy přesušeny přes sloupec Na₂SO₄, a posléze vysušeny pod proudem dusíku při 50 °C. Výsledný produkt byl do další analýsy skladován v malém množství isooktanu při -20 °C.

Analýsy sterolů byly prováděny na kapilárním plynovém chromatografu CP 9000,

vybaveném kapilárním split/splitless injektorem a plamenoionizačním detektorem. Pro analýsu byla použita křemenná kapilární kolona (15 m x 0,32 mm I.D.) s chemicky zakotvenou fází DB-FFAP (J&W Scientific, Folsom, California, USA). Teplota termostatu byla programována od 140 do 240 °C rychlostí 5 K/min, pak isothermálně 30 min. Teplota injektoru a detektoru byla 280 °C. Vstupní tlak nosného plynu (vodík) byl 80 kPa, typ nástřiku split se splitovým poměrem 1:20.

2.6.4.3 Analýsy cholesterolu

Pro analýsu cholesterolu byl použit stejný postup zpracování vzorků jako pro analýsu necholesterolových sterolů, vzorky sera (0,5 ml) obsahovaly navíc jako vnitřní standard 5 α -cholestan o koncentraci 200 mg/dl. Analýsy byly prováděny na kapilárním plynovém chromatografu CP 9001, vybaveném kapilárním split/splitless injektorem a plamenoionizačním detektorem. Pro analýsu byla použita křemenná kapilární kolona (30 m x 0,25 mm I.D.) s chemicky kotvenou fází CP-Sil 8 CB (Chrompack). Teplota termostatu byla programována isothermálně při 300 °C po 6 min. Teplota injektoru a detektoru byla 330 °C. Vstupní tlak nosného plynu (vodík) byl 100 kPa, typ nástřiku split se splitovým poměrem 1:20.

Vyhodnocení chromatogramů

Pro vyhodnocení všech chromatogramů bylo použito integračního programu CSW v.1.7 (Data Apex® Ltd., Praha) nebo software Clarity for Windows® (Data Apex® Ltd., Praha), u studie porovnávající integrační software bylo použito ještě programu MOSAIC® v.5.10 (Chrompack, Middelburg, Holandsko).

2.7 Statistické analýsy

Pro statistické výpočty byl použit software STATISTICA® for Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A., 1999). U párových analýs bylo po provedení testů na normalitu souborů provedeno hodnocení pomocí Studentova dvouvýběrového párového t-testu, u analýs s několika faktory bylo použito analýsy rozptylu s Scheffého nebo Bonferroniho *post hoc* analýsou podle designu studie. Pokud soubory dat nesplňovaly požadavky na normalitu, bylo použito pro nepárový design Mannova-Whitneyho U-testu a pro párový design Wilcoxonova znaménkového testu. Pro mnohonásobné porovnávání distribucí bylo použito Hottelingova t-testu. Korelační závislosti byly hodnoceny pro soubory splňující podmínku normality pomocí Pearsonova korelačního koeficientu, u souborů s nenormálním rozdělením pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Pro porovnání hodnot regresních přímek byl sestaven program v prostředí Microsoft Excel® for Windows, který vycházel z teorie lineární regrese³⁷³.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Metodické studie

3.1.1 *Analýzy zastoupení mastných kyselin v lipidových třídách*

Pro detailní zpracování metodiky stanovení mastných kyselin pomocí kapilární plynové chromatografie bylo nutno zpracovat vliv kroků analýzy na celkový výsledek stanovení profilu mastných kyselin. Ve [Studii I](#) jsme studovali vliv použité kolony a integračního software. U některých studií je možné zkoumat rozdílné analytické matrice. Ve [Studii II](#) jsme se zaměřili na dvě analytické matrice, a to na plasmu a LDL částice. Podrobnější rozbor stanovení profilu mastných kyselin ve fosfolipidech v porovnání s majoritní fosfolipidovou třídou, fosfatidylcholinem, je zpracován ve [Studii III](#).

3.1.2 *Analýzy koncentrace necholesterolových (minoritních) sterolů*

V této kapitole je zpracována metodická část analýzy necholesterolových sterolů ([Studie IV](#)). Je zde popsán vliv typu nástřiku a následné derivatisace na kalibrační závislosti. Je zde také ukázáno na možnost současného stanovení celkového cholesterolu vzorku společně s necholesterolovými steroly a na vliv jednotlivých kroků analýzy na chybu stanovení.

3.2 Experimentální studie

Experimentální část disertace se zabývá vlivem hypolipidemické léčby na profil mastných kyselin v lipidových třídách mozku u potkanů - [Studie V](#).

3.3 Klinické studie

Klinická část disertační práce je rozdělena na dvě části. První část se týká mastných kyselin a necholesterolových sterolů u dvou forem malnutrice, mentální anorexie ([Studie VI](#)) a proteino-energetické malnutrice ([Studie VII](#)).

Druhá část je zaměřena na dietní ovlivnění energetického přísunu u obesních osob, a to nízkokalorické diety u obesních pacientů, a změny v zastoupení mastných kyselin a necholesterolové steroly – [Studie VIII](#).

3.1.1 Analýza mastných kyselin

3.1.1.1 Vliv kolony a software na stanovení mastných kyselin – Studie I

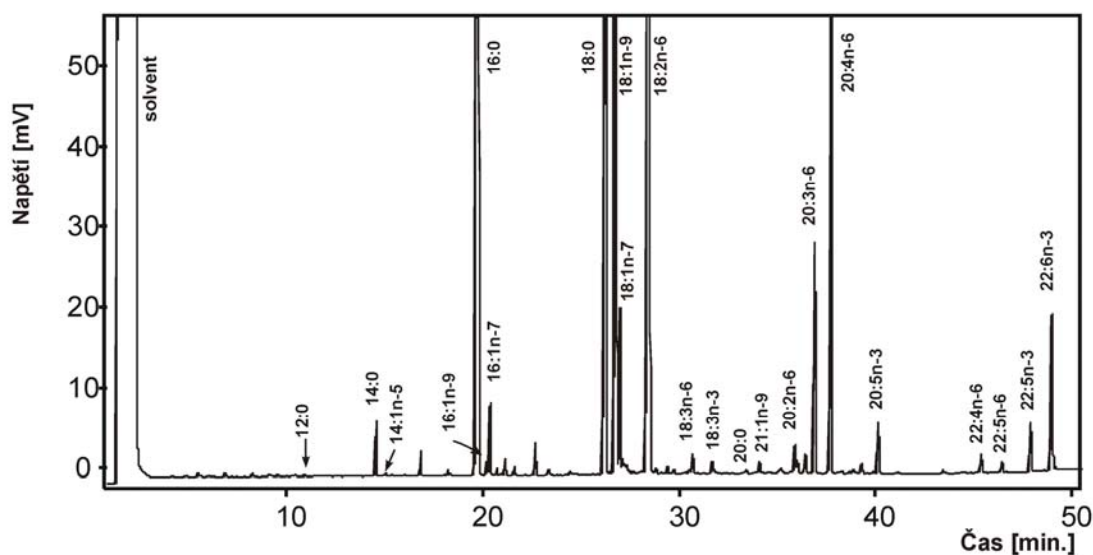
(studie publikována v článku *Vecka M, Tvrzická E, Staňková B, Žák A: Effect of column and software on gas chromatographic determination of fatty acids. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002; 770(1-2): 91-99.*)

Cílem této studie bylo porovnat čtyři kapilární kolony nainstalované v různých chromatografech a výsledky těchto systémů integrovat dvěma různými komerčními software na analýzu mastných kyselin v biologické matrici.

Materiál a metody

Pro účely studie byly do čtyř plynových chromatografů (Chrompack Model 438A, 438S, 9000 a 9001) nainstalovány tyto kapilární kolony: (A) CP-WAX 52 CB, 25 m x 0,25 mm I.D., (B) CP-WAX 52 CB 30 m x 0,25 mm I.D., (C) CP-WAX 58 CB 25 m x 0,32 mm I.D., (Chrompack), (D) Omegawax 320, 30 m x 0,32 mm I.D. (Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A.). Jako biologická matrice byl zvoleno 5 vzorků plasmy o objemu 0,5 ml, ke kterým bylo přidáno 8 mL I.S._{PL}. Profil mastných kyselin byl stanoven podle procedury popsané v [kapitole 2.6.4.1](#).

Obrázek 3.1.1.1 Příklad analýzy vzorku fosfolipidu plasmy



solvent - n-isooktan, nástřik - 1 μ l

Podmínky analýzy: injektor, split/splitless 250 °C, detektor: FID, 270 °C, teplotní program: 150 – 240 °C při 2 K/min, nosný plyn: H₂, tlak na vstupu: 70 kPa. Označení mastných kyselin viz [Tab. 1.1.1](#)

Výsledky a diskuse

Zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech pěti různých vzorků je ukázáno

v Tabulkách 3.1.1.1-5. a příklad chromatogramu je na Obr. 3.1.1.1 Kolona A byla postupně nainstalována do dvou přístrojů, CP 438A (A1) and CP 9000 (A2). Všechny analýsy byly hodnoceny pomocí obou integračních systémů, MOSAIC i CSW. Nejkonstantnějším výsledkem integrace byly rozdíly v zastoupení kyseliny 7-hexadecenové (16:1n-9), které se projeví u kolon A i C, a v zastoupení kyseliny 12-eikosadienové (20:2n-6), jež se projeví pouze u kolony D. Tyto rozdíly jsou způsobeny nedostatečným oddělením příslušných mastných kyselin a matrix vzorku, což nebylo zohledněno při integraci pomocí software MOSAIC (Obr. 3.1.1.1.2).

Tabulka 3.1.1.1 Zastoupení mastných kyselin v plasmatických fosfolipidech – vzorek 1

Kolona	A1		A2		C		D	
	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC
14:0	0,42±0,02	0,43±0,02	0,40±0,01 ^b	0,41±0,01	0,43±0,01 ^b	0,43±0,01	0,46±0,01	0,46±0,01
16:0	26,11±0,42	26,00±0,43	25,68±0,30	25,53±0,30	26,52±0,29	26,34±0,32	26,31±0,25	26,16±0,31
16:1n-9	0,17±0,01 ^{ccc}	0,17±0,01	0,12±0,01	0,18±0,01*	0,11±0,02 ^{ccc}	0,18±0,04 ^{***}	0,13±0,02	0,20±0,01 ^{****}
16:1n-7	0,59±0,01	0,60±0,02	0,57±0,01	0,58±0,01	0,57±0,01	0,58±0,01	0,59±0,01	0,60±0,01
18:0	14,05±0,15	13,99±0,14	14,04±0,13	13,98±0,16	14,19±0,06	14,11±0,07	13,80±0,06	13,72±0,13
18:1n-9	11,55±0,07	11,62±0,03	11,48±0,12	11,83±0,07	11,34±0,09	11,70±0,07	11,38±0,10	11,64±0,06
18:1n-7	1,88±0,05 ^c	1,93±0,01	1,93±0,04	1,95±0,02	2,02±0,04 ^f	2,04±0,03	1,92±0,01	1,94±0,02
18:2n-6	26,26±0,11	26,27±0,08	26,75±0,12	26,71±0,16	26,45±0,11	26,33±0,10	26,33±0,08	26,39±0,10
18:3n-6	0,10±0,01	0,13±0,00	0,11±0,00 ^d	0,11±0,01	0,10±0,00	0,11±0,01	0,08±0,01 ^d	0,09±0,01
18:3n-3	0,47±0,01	0,48±0,01	0,46±0,01	0,46±0,01	0,47±0,01	0,43±0,01	0,46±0,01	0,46±0,03
20:0	0,07±0,01 ^{aaaa}	0,07±0,01	0,07±0,00 ^{bbbb}	0,07±0,00	0,12±0,01 ^{bbbb} aaaa	0,10±0,05	0,09±0,02	0,09±0,00
20:1n-9	0,18±0,01	0,18±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01	0,18±0,01	0,25±0,12	0,16±0,03	0,16±0,01
20:2n-6	0,58±0,02 ^{aaa}	0,59±0,01	0,56±0,01 ^{bb}	0,55±0,02	0,54±0,01	0,53±0,01	0,38±0,01 ^{aaa} bb	0,52±0,02
20:3n-6	2,41±0,05	2,41±0,05	2,44±0,05	2,42±0,05	2,41±0,03	2,39±0,03	2,40±0,03	2,39±0,03
20:4n-6	9,71±0,17	9,67±0,16	9,80±0,20	9,73±0,19	9,51±0,11	9,43±0,10	9,65±0,09	9,66±0,11
20:5n-3	0,97±0,02	0,98±0,02	0,98±0,02	0,96±0,03	0,92±0,02	0,91±0,03	0,97±0,01	0,95±0,03
22:4n-6	0,35±0,01	0,36±0,01	0,34±0,01	0,34±0,01	0,39±0,02	0,40±0,05	0,47±0,18	0,49±0,04
22:5n-6	0,22±0,01	0,23±0,01	0,22±0,01	0,21±0,02	0,20±0,01	0,21±0,01	0,23±0,01	0,23±0,02
22:5n-3	1,04±0,04	1,04±0,04	1,02±0,02	0,99±0,03	0,95±0,03	0,95±0,03	1,02±0,02	1,02±0,02
22:6n-3	2,89±0,10	2,91±0,10	2,85±0,05	2,82±0,05	2,58±0,10	2,59±0,09	2,87±0,06	2,85±0,06
Σ SFA	40,64±0,34	40,49±0,35	40,19±0,32	39,99±0,35	41,26±0,35	40,98±0,37	40,65±0,28	40,43±0,41
Σ MFA	14,36±0,11	14,50±0,05	14,28±0,14	14,71±0,09	14,22±0,08	14,75±0,13	14,19±0,09	14,54±0,08
Σ PUFA n-6	39,62±0,21	39,64±0,17	40,22±0,27	40,07±0,29	39,60±0,27	39,40±0,22	39,85±0,25	39,76±0,26
Σ PUFA n-3	5,37±0,16	5,37±0,23	5,31±0,09	5,27±0,10	4,92±0,13	4,88±0,12	5,31±0,08	5,23±0,07

Profil mastných kyselin byl změřen čtyřmi různými chromatografickými systémy (viz text) a dvěma integračními programy. Každý vzorek byl změřen desetkrát, typický nástřikový objem byl 1 – 2 μ l. Podmínky analýsy: injektor – split/splitless 250°C, detektor – FID 270°C, teplotní program: 150 – 240 °C při 2K/min, nosný plyn H₂, vstupní tlak 70 kPa. Data (molární procenta) jsou ve formátu průměr ± SD. Symboly a zkratky: Σ – suma, * - signifikantní rozdíl (Studentův t-test) od CSW 1.7 integrace u stejné kolony, písmena a, b, c naznačují rozdíl (obecný lineární model s post hoc analýsou dat) u dvojice kolon za použití CSW 1.7 software. Počet symbolů a písmen naznačuje P: < 0.05, < 0.01, < 0.001, a < 0.0001. Označení mastných kyselin viz Tab. 1.1.1.

Tabulka 3.1.1.1.2 Zastoupení mastných kyselin v plasmatických fosfolipidech – vzorek 2

Kolona	A1		A2		C		D	
	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC
14:0	0,22±0,01	0,23±0,01	0,21±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,24±0,00	0,25±0,01	0,25±0,01
16:0	26,99±0,90	26,66±0,86	26,64±0,59	26,49±0,59	28,01±0,75	27,62±0,74	27,61±0,60	27,44±0,64
16:1n-9	0,18±0,01 ^{bbbb}	0,18±0,00	0,11±0,02	0,17±0,01 ^{****}	0,12±0,01 ^{bbbb}	0,18±0,04 ^{****}	0,14±0,01	0,21±0,01 ^{****}
16:1n-7	0,61±0,01	0,62±0,01	0,58±0,02	0,60±0,01	0,63±0,06	0,63±0,02	0,64±0,02	0,65±0,02
18:0	14,29±0,40	14,15±0,41	13,92±0,13	13,86±0,11	14,50±0,43	14,33±0,46	13,70±0,08	13,62±0,09
18:1n-9	9,49±0,19	10,13±0,14 ^{****}	9,88±0,18	10,27±0,08	9,78±0,21	10,23±0,15	9,81±0,09	10,16±0,10
18:1n-7	2,22±0,10 ^{aaaa}	2,28±0,03	2,33±0,02	2,32±0,02	2,42±0,05 ^{aaaa}	2,44±0,04	2,29±0,03	2,31±0,01
18:2n-6	20,72±0,28	20,63±0,28	21,28±0,17	21,23±0,19	21,00±0,49	20,83±0,32	21,24±0,15	21,13±0,16
18:3n-6	0,12±0,01	0,14±0,01	0,12±0,00	0,11±0,01	0,12±0,01	0,13±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01
18:3n-3	0,29±0,01	0,30±0,01	0,29±0,00	0,29±0,00	0,30±0,01	0,28±0,01	0,30±0,01	0,24±0,01
20:0	0,06±0,00 ^{aaaa}	0,07±0,01	0,06±0,00 ^{hh}	0,06±0,01	0,12±0,01 ^{hh} _{aaa}	0,08±0,01 ^{**}	0,08±0,01 ^{cc}	0,08±0,01
20:1n-9	0,16±0,01	0,17±0,01	0,16±0,01	0,15±0,01	0,16±0,01	0,18±0,02	0,15±0,01	0,14±0,00
20:2n-6	0,65±0,03 ^{aaaa}	0,69±0,03	0,61±0,02 ^{hh}	0,60±0,02	0,58±0,10 ^{ccc}	0,62±0,01	0,31±0,01 ^{bbbb} _{aaaa,cccc}	0,55±0,03 ^{****}
20:3n-6	3,85±0,11	3,83±0,11	3,87±0,09	3,85±0,10	3,38±1,18	3,73±0,08	3,77±0,07	3,75±0,08
20:4n-6	12,75±0,32	12,59±0,33	12,82±0,27	12,74±0,26	12,19±0,38	12,07±0,30	12,55±0,25	12,46±0,23
20:5n-3	1,17±0,04	1,20±0,03	1,18±0,04	1,17±0,03	1,10±0,05	1,11±0,06	1,18±0,03	1,11±0,04
22:4n-6	0,39±0,02	0,39±0,03	0,37±0,02	0,36±0,02	0,41±0,04	0,40±0,04	0,36±0,02	0,34±0,01
22:5n-6	0,31±0,02	0,32±0,04	0,30±0,02	0,30±0,02	0,27±0,01	0,28±0,01	0,28±0,01	0,27±0,02
22:5n-3	1,17±0,07	1,17±0,09	1,13±0,05	1,11±0,05	1,03±0,06	1,03±0,05	1,12±0,04	1,11±0,04
22:6n-3	4,33±0,21 ^{aaaa}	4,27±0,23	4,13±0,20 ^{hh}	4,08±0,20	3,65±0,23 ^{hh} _{aaa}	3,60±0,22	4,12±0,14 ^{ccc}	4,08±0,13
Σ SFA	41,57±1,27	41,11±1,24	40,84±0,64	40,64±0,63	42,85±1,19	42,26±1,20	41,64±0,61	41,40±0,67
Σ MFA	12,67±0,29	13,37±0,19*	13,06±0,16	13,51±0,11	13,11±0,27	13,66±0,18	13,03±0,10	13,46±0,10
Σ PUFA n-6	38,79±0,72	38,59±0,76	39,37±0,41	39,19±0,40	37,96±1,00	38,06±0,73	38,60±0,44	38,60±0,45
Σ PUFA n-3	6,97±0,32	6,93±0,34	6,72±0,20	6,54±0,19	6,08±0,33 ^{aaaa} _{b,c}	6,02±0,33	6,73±0,29 ^c	6,65±0,27

vysvětlivky viz tab. 3.1.1.1.1

Rozdíly mezi jednotlivými kolonami byly nejvíce zřetelné pro kolonu D, která se odlišovala od ostatních v případě mastných kyselin 14:0, 16:1n-9, 20:0 a 20:2n-6. Navíc jsme u této kolony pozorovali neidentifikovatelnou příměs znemožňující integraci mastných kyselin 22:4n-6 a 22:5n-6. Výsledky u těchto kyselin byly získány pro software CSW měřením výšky peaku a pro MOSAIC ruční korekcí. Pro provedení kalibrace byla tak kolona D nevhodná, protože tyto kyseliny jsou zastoupeny v plasmatických TAG a PL v malých množstvích, více citlivých k chybám integrace. Na druhé straně oddělení nečistoty od kyseliny 11,14-eikosadienové (20:2n-6) bylo možné jen u kolony D, jak dokumentují rozdílné výsledky pomocí integrace programů CSW a MOSAIC. Výsledky u kolony A i C jsou pro tuto kyselinu nadhodnoceny a bylo nutno použít manuální korekce vycházející z výšky peaku (korekční faktory 0.739, 0.705, 0.861, 0.705, 0.746 pro vzorky 1, 2, 3, 4, resp. 5), abychom dostali údaje srovnatelné s kolonou D. Kolona C se lišila od kolon A1 a A2 pro kyselinu 20:0 (všechny vzorky), 16:1n-9 (vzorky 1, 2 a 3), 18:1n-7 (vzorky 1 a 2) a DHA (vzorek 2). Tato kolona je o trochu polárnější než kolona A, pořadí eluce zůstává stejné, i když výsledky

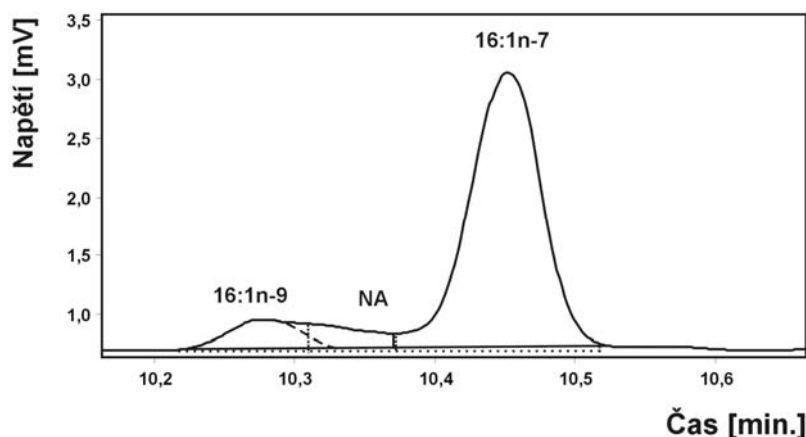
mohou být ovlivněny jiným rozlišením blízko eluovaných složek a také vlivem neočekávaných nečistot z matrix vzorku.

Tabulka 3.1.1.1.3 Zastoupení mastných kyselin v plasmatických fosfolipidech – vzorek 3

Kolona	A1		A2		C		D	
Software	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC
14:0	0,34±0,02 ^{aaaa}	0,34±0,02	0,32±0,01 ^{bbbb}	0,33±0,01	0,33±0,01 ^{cccc}	0,34±0,01	0,38±0,01 ^{bbbb} _{aaaa,cccc}	0,38±0,01
16:0	27,00±1,09	26,84±1,09	26,48±0,34	26,41±0,39	27,05±0,54	26,87±0,58	27,74±0,21	27,47±0,23
16:1n-9	0,29±0,01 ^{bbbb} _{cccc}	0,30±0,01	0,21±0,02	0,29±0,01 ^{****}	0,23±0,02 ^{bbbb}	0,29±0,01 ^{****}	0,22±0,02 ^{cccc}	0,34±0,01 ^{****}
16:1n-7	1,62±0,06	1,61±0,06	1,64±0,02	1,47±0,52	1,60±0,04	1,62±0,04	1,75±0,02	1,73±0,02
18:0	14,97±0,65	14,91±0,62	14,72±0,07	14,69±0,07	15,13±0,64	15,05±0,66	14,42±0,09	14,35±0,07
18:1n-9	16,19±0,50	16,19±0,44	16,54±0,08	16,76±0,09	16,15±0,35	16,26±0,34	16,43±0,10	16,46±0,04
18:1n-7	2,90±0,09	2,92±0,07	3,02±0,02	3,04±0,02	3,01±0,12	3,01±0,06	2,99±0,02	2,98±0,01
18:2n-6	16,56±0,52	16,69±0,50	16,94±0,07	16,98±0,11	16,68±0,36	16,67±0,34	16,87±0,07	16,75±0,08
18:3n-6	0,21±0,01	0,23±0,02	0,21±0,00	0,21±0,00	0,20±0,01	0,21±0,01	0,19±0,01	0,20±0,01
18:3n-3	0,32±0,01	0,33±0,02	0,32±0,00	0,32±0,01	0,32±0,01	0,32±0,02	0,31±0,01	0,27±0,03
20:0	0,07±0,00 ^{aaaa}	0,07±0,01	0,06±0,01 ^{bbbb}	0,06±0,01	0,12±0,01 ^{bbbb} _{aaaa}	0,07±0,01 ^{****}	0,09±0,00	0,09±0,01
20:1n-9	0,22±0,01	0,22±0,01	0,21±0,01	0,20±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01
20:2n-6	1,84±0,07 ^{aaaa}	1,88±0,07	1,86±0,03 ^{bbbb}	1,86±0,04	1,80±0,04 ^{cccc}	1,80±0,04	1,34±0,23 ^{bbbb} _{aaaa,cccc}	1,77±0,04 ^{****}
20:3n-6	3,87±0,14	3,88±0,13	3,96±0,05	3,95±0,05	3,89±0,09	3,90±0,08	3,85±0,04	3,84±0,03
20:4n-6	8,38±0,28	8,34±0,28	8,44±0,11	8,42±0,11	8,26±0,19	8,28±0,18	8,23±0,06	8,19±0,05
20:5n-3	0,99±0,04	1,02±0,04	0,97±0,02	0,96±0,04	0,95±0,03	0,96±0,04	0,96±0,09	0,96±0,02
22:4n-6	0,44±0,02	0,44±0,02	0,43±0,01	0,43±0,01	0,51±0,03	0,51±0,03	0,38±0,11	0,42±0,00
22:5n-6	0,43±0,02	0,43±0,02	0,42±0,01	0,41±0,02	0,40±0,01	0,40±0,01	0,36±0,03	0,39±0,01
22:5n-3	0,91±0,04	0,90±0,06	0,89±0,02	0,87±0,02	0,85±0,03	0,86±0,04	0,91±0,10	0,87±0,01
22:6n-3	2,47±0,11	2,45±0,12	2,36±0,05	2,33±0,05	2,30±0,08	2,36±0,09	2,37±0,03	2,34±0,03
Σ SFA	42,37±1,66	42,16±1,63	41,58±0,31	41,51±0,43	42,62±1,16	42,33±1,21	42,63±0,25	42,29±0,19
Σ MFA	21,22±0,62	21,24±0,54	21,62±0,07	21,76±0,42	21,21±0,38	21,41±0,44	21,59±0,10	21,71±0,03
Σ PUFA n-6	31,72±0,94	31,89±0,92	32,27±0,22	32,26±0,25	31,75±0,70	31,76±0,66	31,23±0,21	31,55±0,16
Σ PUFA n-3	4,69±0,18	4,70±0,22	4,55±0,15	4,45±0,05	4,42±0,14	4,50±0,14	4,53±0,09	4,48±0,10

vysvětlivky viz tab. 3.1.1.1.1

Obrázek 3.1.1.1.2 Detail integrace vzorku



Podmínky integrace: CSW software – čárkovaná čára, MOSAIC software – plná čára. Na obrázku je naznačen teoreticky oddělený peak kyseliny 7-hexadecenové (16:1n-9) od neidentifikované příměsi (NA) a kyseliny palmitolejové (16:1n-7). Podmínky analýzy jsou stejné jako u obr. 3.1.1.1.1

Tabulka 3.1.1.1.4 Zastoupení mastných kyselin v plasmatických fosfolipidech – vzorek 4

Kolona	A1		A2		C		D	
	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC
14:0	0,24±0,01	0,25±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,23±0,01	0,24±0,00	0,26±0,01	0,26±0,01
16:0	29,19±0,35	29,10±0,36	28,79±0,35	28,71±0,34	28,93±0,14	28,81±0,14	29,64±0,26	29,45±0,31
16:1n-9	0,14±0,02	0,16±0,01	0,11±0,01	0,17±0,00***	0,11±0,01	0,17±0,00***	0,13±0,02	0,20±0,01***
16:1n-7	0,80±0,01	0,81±0,01	0,79±0,01	0,80±0,01	0,78±0,01	0,80±0,01	0,82±0,01	0,82±0,01
18:0	13,04±0,08	12,99±0,08	13,11±0,05	13,07±0,04	13,21±0,05	13,17±0,05	12,94±0,07	12,87±0,05
18:1n-9	10,09±0,05	10,06±0,05	10,09±0,04	10,20±0,02	10,06±0,07	10,15±0,07	9,98±0,06	10,07±0,03
18:1n-7	1,78±0,01	1,78±0,01	1,79±0,01	1,80±0,01	1,80±0,02	1,84±0,01	1,77±0,02	1,79±0,02
18:2n-6	19,91±0,10	20,02±0,12	20,23±0,04	20,24±0,07	20,10±0,13	20,12±0,12	20,09±0,05	20,03±0,05
18:3n-6	0,13±0,00	0,14±0,01	0,13±0,00	0,12±0,01	0,12±0,01	0,13±0,00	0,11±0,00	0,12±0,01
18:3n-3	0,21±0,00	0,21±0,01	0,20±0,00	0,20±0,01	0,21±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01
20:0	0,04±0,00 ^{aaaa}	0,05±0,00	0,04±0,00 ^{bbbb}	0,05±0,00	0,09±0,00 ^{bbbb} ^{aaaa}	0,05±0,00***	0,07±0,00	0,07±0,01
20:1n-9	0,17±0,00	0,18±0,01	0,17±0,00	0,17±0,00	0,18±0,00	0,19±0,00	0,17±0,01	0,17±0,01
20:2n-6	0,72±0,01 ^{aaaa}	0,75±0,02	0,71±0,02 ^{bbbb}	0,71±0,02	0,71±0,01 ^{cccc}	0,71±0,01	0,44±0,01 ^{bbbb} ^{aaaa,cccc}	0,68±0,02***
20:3n-6	3,98±0,05	3,98±0,05	4,04±0,05	4,03±0,04	4,04±0,02	4,04±0,07	3,97±0,04	3,95±0,04
20:4n-6	11,87±0,12	11,84±0,12	11,99±0,13	11,95±0,13	11,89±0,04	11,89±0,05	11,81±0,11	11,74±0,09
20:5n-3	1,52±0,02	1,53±0,02	1,51±0,03	1,53±0,02	1,50±0,02	1,49±0,03	1,53±0,01	1,53±0,02
22:4n-6	0,36±0,01	0,36±0,01	0,36±0,01	0,35±0,01	0,39±0,01	0,39±0,01	0,36±0,09	0,35±0,00
22:5n-6	0,20±0,00	0,20±0,01	0,20±0,01	0,19±0,01	0,19±0,01	0,18±0,01	0,16±0,01	0,19±0,00
22:5n-3	1,03±0,02	1,03±0,02	1,02±0,02	1,00±0,02	1,00±0,02	1,00±0,02	1,02±0,02	1,00±0,03
22:6n-3	4,59±0,09	4,55±0,09	4,49±0,07	4,46±0,07	4,45±0,07	4,42±0,06	4,54±0,08	4,51±0,07
Σ SFA	42,51±0,35	42,39±0,36	42,17±0,31	42,06±0,31	42,47±0,17	42,28±0,16	42,91±0,21	42,66±0,27
Σ MFA	12,98±0,08	12,99±0,06	12,95±0,04	13,15±0,02	12,94±0,11	13,15±0,09	12,86±0,07	13,06±0,05
Σ PUFA n-6	37,17±0,22	37,29±0,23	37,66±0,21	37,60±0,21	37,44±0,12	37,46±0,12	36,95±0,16	37,05±0,16
Σ PUFA n-3	7,35±0,13	7,33±0,13	7,28±0,09	7,24±0,11	7,16±0,09	7,11±0,10	7,22±0,12	7,19±0,11

vysvětlivky viz tab. 3.1.1.1.1

Stanovení kyseliny vakcenové (18:1n-7) je ovlivněno neúplným rozdělením od předcházející OA, které je v plasmatických PL 5-6 krát více a rozdíl v retenčních časech je přibližně 0,17 – 0,18 min. Podobná situace je u plasmatických CE, vliv rozdělení bude ještě větší u plasmatických TAG, kde je zastoupení OA o řád větší než kyseliny vakcenové (18:1n-7) a rozdíl v retenčních časech je ještě menší – asi 0,12-0,13 min. Dalším kritickým párem je POA s kyselinou 7-hexadecenovou (16:1n-9). Ztráta separační schopnosti u těchto kritických párů, kterou nelze zvrátit změnou podmínek analýzy, je neklamnou známkou konce životnosti kolony. Výsledky pro kolonu A postupně instalovanou ve dvou přístrojích se významně nelišily, což potvrzuje zanedbatelný příspěvek optimálně nastaveného chromatografického systému k celkové chybě analýzy.

Statistické zhodnocení kalibračních závislostí pro kolony A, B a C je uvedeno v [tabulce 3.1.1.1.6](#). Výsledky dokumentují lineární závislost pro celé koncentrační rozpětí (tři řády) u všech tří ředění. Směrnice regresních rovnic jsou blízké jedné a absolutní členy jsou pouze minimální. Korelační koeficienty dále potvrzují platnost lineárního vztahu probíhajícího počátkem, tedy můžeme říci, že všechny systémy pracovaly za optimálních podmínek.

Tabulka 3.1.1.1.5 Zastoupení mastných kyselin v plasmatických fosfolipidech – vzorek 5

Kolona	A1		A2		C		D	
	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC	CSW 1.7	MOSAIC
14:0	0,24±0,01	0,25±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,24±0,01	0,25±0,01	0,27±0,01	0,27±0,01
16:0	27,89±0,49	27,87±0,47	27,62±0,56	27,55±0,55	28,02±0,32	27,87±0,31	28,79±0,22	28,57±0,27
16:1n-9	0,10±0,02	0,17±0,01****	0,09±0,01	0,16±0,01****	0,09±0,01	0,17±0,00****	0,09±0,01	0,19±0,00****
16:1n-7	0,89±0,02	0,90±0,03	0,89±0,02	0,89±0,02	0,89±0,02	0,90±0,02	0,91±0,01	0,93±0,01
18:0	14,97±0,23	14,97±0,22	15,04±0,05	15,01±0,04	15,15±0,16	15,07±0,15	14,85±0,06	14,74±0,04
18:1n-9	11,38±0,05	11,37±0,05	11,44±0,05	11,52±0,05	11,37±0,09	11,47±0,09	11,33±0,04	11,36±0,02
18:1n-7	1,74±0,02	1,74±0,01	1,76±0,01	1,77±0,01	1,77±0,02	1,80±0,02	1,75±0,01	1,75±0,01
18:2n-6	16,87±0,08	16,90±0,10	17,17±0,08	17,20±0,10	17,05±0,09	17,03±0,10	17,13±0,04	17,03±0,03
18:3n-6	0,18±0,00	0,17±0,01	0,17±0,00	0,17±0,01	0,15±0,01	0,17±0,00	0,16±0,01	0,16±0,00
18:3n-3	0,24±0,00	0,24±0,00	0,24±0,00	0,24±0,01	0,24±0,01	0,23±0,01	0,23±0,01	0,23±0,04
20:0	0,05±0,01 ^{aaaa}	0,06±0,01	0,05±0,01 ^{bbbb}	0,05±0,01	0,10±0,00 ^{bbbb}	0,06±0,01 ^{aaaa} *	0,07±0,00	0,07±0,01
20:1n-9	0,18±0,01	0,17±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,18±0,00	0,19±0,02	0,17±0,01	0,17±0,01
20:2n-6	0,97±0,02 ^{aaaa}	0,96±0,02	0,95±0,02 ^{bbbb}	0,93±0,02	0,95±0,01 ^{cccc}	0,96±0,01	0,43±0,03 ^{bbbb}	0,91±0,02 ^{aaaa,cccc}
20:3n-6	5,09±0,08	5,09±0,08	5,12±0,11	5,11±0,11	5,09±0,05	5,08±0,04	5,00±0,05	4,96±0,05
20:4n-6	11,98±0,16	11,96±0,17	12,06±0,25	12,02±0,25	11,83±0,11	11,82±0,12	11,79±0,10	11,72±0,09
20:5n-3	1,40±0,02	1,41±0,02	1,37±0,04	1,39±0,04	1,36±0,03	1,39±0,04	1,38±0,03	1,39±0,03
22:4n-6	0,47±0,01	0,46±0,01	0,45±0,02	0,46±0,02	0,49±0,01	0,49±0,01	0,45±0,02	0,44±0,00
22:5n-6	0,36±0,01	0,37±0,01	0,36±0,02	0,35±0,03	0,34±0,01	0,33±0,04	0,40±0,12	0,34±0,00
22:5n-3	1,08±0,03	1,06±0,03	1,04±0,05	1,03±0,05	1,02±0,03	1,04±0,02	1,06±0,02	1,06±0,03
22:6n-3	3,92±0,13	3,89±0,13	3,75±0,19	3,73±0,18	3,68±0,12	3,67±0,13	3,73±0,06	3,72±0,07
Σ SFA	43,16±0,37	43,14±0,34	42,95±0,57	42,85±0,56	43,51±0,34	43,25±0,32	43,98±0,19	43,66±0,25
Σ MFA	14,29±0,08	14,35±0,08	14,35±0,07	14,52±0,08	14,29±0,11	14,54±0,13	14,25±0,04	14,39±0,03
Σ PUFA n-6	35,91±0,23	35,91±0,22	36,29±0,36	36,24±0,36	35,90±0,19	35,88±0,21	35,36±0,11	35,56±0,13
Σ PUFA n-3	6,64±0,17	6,60±0,17	6,40±0,07	6,39±0,14	6,30±0,18	6,33±0,18	6,41±0,27	6,38±0,27

vysvětlivky viz tab. 3.1.1.1.1

Tabulka 3.1.1.1.6 Kalibrační závislosti

Neřaděná standardní směs

	Kolona A	R ²	Kolona B	R ²	Kolona C	R ²
10:0	$y = 0,988x + 0,018$	0,9976	$y = 0,973x - 0,038$	0,9974	$y = 1,003x - 0,006$	0,9990
12:0	$y = 1,006x - 0,007$	0,9988	$y = 0,978x - 0,054$	0,9973	$y = 1,028x - 0,029$	0,9990
14:0	$y = 1,013x - 0,008$	0,9988	$y = 0,983x - 0,030$	0,9975	$y = 1,037x - 0,021$	0,9989
16:0	$y = 1,024x + 0,012$	0,9987	$y = 1,001x + 0,014$	0,9979	$y = 1,028x - 0,002$	0,9992
18:0	$y = 1,026x - 0,007$	0,9984	$y = 1,021x + 0,001$	0,9983	$y = 1,034x - 0,006$	0,9987
20:0	$y = 1,035x - 0,002$	0,9980	$y = 1,044x - 0,013$	0,9987	$y = 1,026x - 0,006$	0,9984
22:0	$y = 1,033x - 0,007$	0,9978	$y = 1,052x - 0,060$	0,9989	$y = 1,013x - 0,025$	0,9981
24:0	$y = 1,036x - 0,027$	0,9977	$y = 1,038x - 0,120$	0,9984	$y = 1,006x - 0,061$	0,9978

řadění 1:10

	Kolona B	R ²	Kolona C	R ²
10:0	$y = 1,000x - 0,075$	0,9991	$y = 0,966x - 0,054$	0,9970
12:0	$y = 1,023x - 0,096$	0,9989	$y = 0,988x - 0,080$	0,9982
14:0	$y = 1,021x - 0,081$	0,9988	$y = 0,995x - 0,076$	0,9986
16:0	$y = 1,025x - 0,032$	0,9987	$y = 0,997x - 0,045$	0,9986
18:0	$y = 1,024x - 0,021$	0,9986	$y = 0,989x - 0,051$	0,9989
20:0	$y = 1,030x + 0,003$	0,9985	$y = 0,994x - 0,039$	0,9990
22:0	$y = 1,031x + 0,004$	0,9985	$y = 0,981x - 0,037$	0,9991
24:0	$y = 1,025x - 0,016$	0,9984	$y = 0,991x - 0,073$	0,9990

Tabulka 3.1.1.1.6 Kalibrační závislosti (pokračování)
ředění 1:20

	Kolona B	R^2	Kolona C	R^2
10:0	$y = 0,993x + 0,028$	0,9987	$y = 1,014x + 0,031$	0,9980
12:0	$y = 0,992x - 0,007$	0,9987	$y = 1,022x - 0,039$	0,9979
14:0	$y = 0,988x - 0,010$	0,9984	$y = 1,009x - 0,050$	0,9984
16:0	$y = 0,991x + 0,014$	0,9982	$y = 1,005x - 0,030$	0,9987
18:0	$y = 0,992x - 0,011$	0,9977	$y = 1,005x - 0,029$	0,9987
20:0	$y = 0,999x - 0,015$	0,9972	$y = 1,008x - 0,005$	0,9987
22:0	$y = 1,003x - 0,037$	0,9977	$y = 1,002x + 0,028$	0,9982
24:0	$y = 1,004x - 0,052$	0,9976	$y = 1,014x - 0,021$	0,9988

Počet bodů regresní přímky = ; x , poměr koncentrací c_i/c_{IS} ; y , poměr ploch peaků A_i/A_{IS} ; $I.S.$, 19:0. Složení standardní směsi viz kapitola 2.2. Označení mastných kyselin viz Tab. 1.1.1

U klinických studií porovnávajících velká množství pacientů jsou rozdíly v zastoupení minoritních mastných kyselin zanedbatelné; u malých intervenčních studií (klampové studie vyžadující opakovaná měření) nebo experimentální studie s přesně definovanými zvířecími soubory nebo buněčnými liniemi i tyto rozdíly mohou hrát roli v statistické významnosti. Proto je lépe používat za takto nastavených metodických požadavků pouze jednu kolonu nainstalovanou v jednom chromatografickém systému. Další zpřesnění výsledků je možné dosáhnout duplicitními analysami. Přidání jednoho vnitřního standardu eluovaného přibližně ve středu času analýzy se zdá dostatečné pro ty biologické vzorky, které neobsahují příliš těkavé složky. Porovnání enzymatického stanovení jednotlivých lipidových tříd s chromatografickými metodami založenými na použití kyseliny heptadekanové (17:0) ukázalo dobrou shodu³⁴⁷. Přesnost je zachována v širokém rozpětí koncentrací, což dovoluje přidání vnitřního standardu při pouze přibližné znalosti koncentrací relevantních lipidových tříd.

Závěr

Oba integrační programy se ve většině výsledků nelišily; rozdíly byly patrné pouze u minoritních složek. Výsledky naznačují, že CSW software je vhodnější pro integraci komplikovanějších chromatogramů. Rozdíly mezi kolonami byly pozorovány u minoritních mastných kyselin a episodicky u kyseliny vakcenové. Lineární kalibrační závislosti naměřené pomocí směsí nasycených mastných kyselin potvrdily teoretické vztahy, pokud jsou analýzy prováděny za optimálních podmínek. Použití pouze jednotlivé kolony instalované v jednom přístroji je vhodné pro malé intervenční nebo experimentální metabolické studie.

3.1.1.2 Vliv použité analytické matrice na stanovení mastných kyselin – Studie II

(Studie publikována jako část článku *Tvrzická E, Vecka M, Staňková B, Žák A: Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionisation detection: Quantitative aspects. Anal Chim Acta 2002; 465(1-2): 337-350.*)

Rozdíly v zastoupení mastných kyselin v jednotlivých lipoproteinových třídách jsou popisovány u zdravých jedinců i různých typů hyperlipoproteinemií³⁷⁴⁻³⁷⁷. Do pozorovaných změn v zastoupení jednotlivých mastných kyselin mezi lipoproteinovými třídami může zasahovat i interindividuální variabilita a celková chyba analytické metody. Proto byl v této studii zhodnocen příspěvek jednotlivých kroků analýzy k celkové chybě stanovení a bylo porovnáno složení mastných kyselin v plasmě, LDL a VLDL.

Materiál a metody

Osoby zahrnuté do studie (n = 151) byly rozděleny na normolipoproteinemické (NLP, n = 59) a hyperlipoproteinemické (HLP, n = 92) podle kritérií v Tabulce 2.1. Hyperlipoproteinemická skupina sestávala z osob s hypercholesterolemií (HC, n = 25), hypertriacylglycerolemií (HTG, n = 30) a smíšenou hyperlipoproteinemií (MHLP, n = 37).

Vzorky krve obsahující EDTA 1 mg/ml byly získány po 12h lačnění. Objem plasmy vzatý do centrifugačního procesu byl 3 ml; částice VLDL a LDL byly separovány sekvenční ultracentrifugací (kapitola 2.6.2), separované lipoproteiny byly rekonstituovány na původní objem a rozděleny na tři alikvoty, jež podstoupily další analýzy zvlášť. Profil mastných kyselin byl stanoven podle procedury popsané v kapitole 2.6.4.1.

Výsledky

Mastné kyseliny v VLDL a LDL lipoproteinech

Zastoupení mastných kyselin v CE, TAG a PL v celkovém objemu plasmy a separovaných LDL pro skupiny NLP (normolipoproteinemičtí jedinci) a HLP (hyperlipoproteinemie) je uvedeno v Tab. 3.1.1.2.1. U skupiny NLP ve všech lipidových třídách bylo zaznamenáno nižší zastoupení SFA a vyšší zastoupení PUFA n-3 i n-6 při porovnání plasmy a LDL. Složení mastných kyselin v HDL a LDL bylo několikrát publikováno jako podobné^{374,375,377}, rozdíly mezi zastoupením mastných kyselin v plasmě a LDL jdou tak na vrub částic VLDL. Tyto rozdíly vykazují značnou míru individuální variability. Výsledky této studie jsou tak v souladu s publikovanými zjištěními. Nekonsistentní výsledky v rozdílech u skupiny HLP jsou způsobeny změněným metabolismem lipoproteinů za této patofysiologické situace. Pouze dvě minoritní mastné kyseliny, 20:0 a 20:2n-6, měly u všech lipidových tříd v LDL zvýšené

zastoupení vůči plasmě. U obou skupin dosahovaly individuální rozdíly mezi plasmou a LDL záporných i kladných hodnot s absolutními hodnotami, jež byly řádově porovnatelné se standardními odchylkami stanovení mastných kyselin.

Příspěvek jednotlivých kroků k celkové chybě analýzy

Stanovení profilu mastných kyselin v plasmě i jednotlivých lipidových třídách separovaných lipoproteinů zahrnuje několik kroků, které mohou ovlivnit konečný výsledek. Příspěvek jednotlivých kroků k celkové chybě metody byl určen podle schématu:

1. ultracentrifugace
2. extrakce celkového lipidu
3. TLC separace lipidových tříd
4. methylace
5. GC stanovení

Každý vzorek byl centrifugován ve dvou zkumavkách, poskytuje tak 6 alikvotů. Sekvence kroků 2-4 poskytla 6 vzorků methylesterů mastných kyselin pro každou třídu CE, TAG a PL. Každý vzorek methylesterů byl analysován v GC systému třikrát, t.j. celkem 18 chromatogramů ve faktoriálovém designu. Krok 4, methylace, byl hodnocen zvlášť za použití 6 alikvotů PL a TAG, které byly methylovány a poté třikrát analysovány pomocí GC. Výsledky jsou shrnuty v [tabulce 3.1.1.2.2](#). Plynová chromatografie přispěla jen minimálně k celkové chybě, hodnoty RSD byly pod 1 % pro většinu složek, jen pro minoritní složky byly pozorovány vyšší hodnoty – u kyseliny laurové (12:0) 3,3 and 5,1 %. Zastoupení kyseliny vakcenové (18:1n-7) v PL a TAG je podobné, rozdíl v RSD je zřejmě způsoben OA, jež je eluována přibližně 0,2 min před kyselinou vakcenovou (18:1n-7) a její zastoupení je v PL jen pětinašobné, kdežto v TAG je ve více než desetinásobném nadbytku.

Tabulka 3.1.1.2.1 Rozdíly ve složení mastných kyselin v CE, TAG a PL mezi plasmou a LDL

Mastná kyselina	Skupina	CE			TAG			PL		
		Plasma	LDL	P ^a	Plasma	LDL	P	Plasma	LDL	P
14:0	NLP ^b	0,81 ± 0,31	1,4 ± 1,0	↓↓↓	1,6 ± 0,83	2,4 ± 2,0	↓	0,27 ± 0,10	0,54 ± 0,33	↓↓↓
	HLP ^c	0,90 ± 0,25	1,2 ± 0,63	↓↓↓	2,0 ± 0,93	1,8 ± 0,83	↑↑↑	0,31 ± 0,12	0,45 ± 0,20	↓↓↓
16:0	NLP	11 ± 1,1	13 ± 2,4	↓↓↓	23 ± 3,9	25 ± 4,1	↓	27 ± 2,0	28 ± 2,7	↓
	HLP	12 ± 1,1	13 ± 2,5	↓	26 ± 3,4	25 ± 3,3	↑	29 ± 3,2	28 ± 2,3	↑
16:1n-7	NLP	2,3 ± 0,66	2,4 ± 0,52		3,2 ± 1,1	2,7 ± 0,66	↑↑↑	0,60 ± 0,16	0,67 ± 0,22	↓
	HLP	3,9 ± 1,8	3,6 ± 1,6	↑	4,1 ± 1,4	3,7 ± 1,2	↑↑↑	0,79 ± 0,32	0,84 ± 0,32	
18:0	NLP	1,4 ± 0,34	2,2 ± 1,2	↓↓↓	4,5 ± 1,3	5,8 ± 2,0	↓↓↓	15 ± 1,4	15 ± 1,1	
	HLP	1,3 ± 0,32	2,4 ± 1,5	↓↓↓	4,3 ± 1,3	4,7 ± 1,1	↓↓↓	15 ± 1,8	15 ± 1,5	↑
18:1n-9	NLP	20 ± 2,6	20 ± 2,0		42 ± 4,6	40 ± 4,6	↑	11 ± 1,2	12 ± 1,5	↓
	HLP	22 ± 3,8	21 ± 2,9	↑	41 ± 3,5	42 ± 3,2	↓↓↓	12 ± 1,8	12 ± 2,0	
18:1n-7	NLP	1,6 ± 0,19	1,7 ± 0,28	↓	3,4 ± 0,59	3,4 ± 0,62		2,3 ± 0,36	2,5 ± 0,37	↓↓↓
	HLP	1,6 ± 0,22	1,6 ± 0,25		3,4 ± 0,44	3,1 ± 0,40	↑↑↑	2,2 ± 0,38	2,3 ± 0,36	
18:2n-6	NLP	54 ± 4,0	52 ± 4,8	↑	18 ± 4,8	15 ± 4,9	↑↑↑	25 ± 3,3	25 ± 2,7	
	HLP	49 ± 5,3	48 ± 6,4		15 ± 4,2	14 ± 4,1	↑	25 ± 4,4	22 ± 3,3	↓↓↓
18:3n-6	NLP	0,67 ± 0,24	0,60 ± 0,20	↑	0,27 ± 0,13	0,29 ± 0,12		0,07 ± 0,04	0,09 ± 0,05	↓
	HLP	0,91 ± 0,34	0,82 ± 0,30	↑↑↑	0,30 ± 0,14	0,33 ± 0,16	↓	0,08 ± 0,04	0,13 ± 0,08	↓↓↓
18:3n-3	NLP	0,65 ± 0,16	0,62 ± 0,17		1,2 ± 0,53	1,0 ± 0,41	↑	0,26 ± 0,12	0,35 ± 0,16	↓↓↓
	HLP	0,63 ± 0,14	0,60 ± 0,16		1,0 ± 0,40	0,95 ± 0,40		0,23 ± 0,09	0,36 ± 0,25	↓↓↓
20:0	NLP	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,08	↓↓↓	0,12 ± 0,07	0,17 ± 0,06	↓↓↓	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,06	↓↓↓
	HLP	0,04 ± 0,02	0,13 ± 0,11	↓↓↓	0,10 ± 0,05	0,12 ± 0,04	↓↓↓	0,09 ± 0,03	0,15 ± 0,06	↓↓↓
20:1n-9	NLP	0,05 ± 0,05	0,08 ± 0,05	↓	0,44 ± 0,21	0,39 ± 0,13		0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,06	↓↓↓
	HLP	0,06 ± 0,03	0,11 ± 0,16	↓	0,44 ± 0,24	0,40 ± 0,17	↑	0,20 ± 0,07	0,19 ± 0,06	
20:2n-6	NLP	0,14 ± 0,13	0,21 ± 0,19	↓	0,28 ± 0,09	0,44 ± 0,20	↓↓↓	0,45 ± 0,07	0,52 ± 0,18	↓
	HLP	0,11 ± 0,05	0,27 ± 0,20	↓↓↓	0,22 ± 0,08	0,29 ± 0,15	↓↓↓	0,43 ± 0,11	0,53 ± 0,16	↓↓↓
20:3n-6	NLP	0,65 ± 0,25	0,76 ± 0,36	↓	0,30 ± 0,11	0,36 ± 0,38		2,9 ± 0,58	2,9 ± 0,55	
	HLP	0,69 ± 0,20	0,72 ± 0,23		0,26 ± 0,09	0,31 ± 0,20	↓	3,2 ± 0,77	3,2 ± 0,65	
20:4n-6	NLP	5,5 ± 0,99	4,9 ± 1,1	↑↑↑	1,0 ± 0,26	1,3 ± 0,85	↓	9,8 ± 1,7	8,3 ± 1,6	↑↑↑
	HLP	5,9 ± 1,2	5,6 ± 1,7	↑	0,97 ± 0,32	1,3 ± 0,60	↓↓↓	10 ± 3,8	9,4 ± 2,2	↑
20:5n-3	NLP	0,51 ± 0,23	0,37 ± 0,20	↑↑↑	0,18 ± 0,08	0,17 ± 0,12		0,83 ± 0,32	0,68 ± 0,26	↑↑↑
	HLP	0,68 ± 0,33	0,49 ± 0,30	↑↑↑	0,19 ± 0,15	0,22 ± 0,15		0,96 ± 0,48	0,93 ± 0,48	
22:4n-6	NLP	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,06	↓	0,13 ± 0,05	0,14 ± 0,05		0,35 ± 0,08	0,29 ± 0,07	↑↑↑
	HLP	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,08	↓↓↓	0,11 ± 0,04	0,14 ± 0,06	↓↓↓	0,34 ± 0,09	0,34 ± 0,11	
22:5n-3	NLP	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,04	↓	0,31 ± 0,11	0,27 ± 0,13	↑	1,0 ± 0,25	0,85 ± 0,22	↑↑↑
	HLP	0,06 ± 0,03	0,11 ± 0,08	↓↓↓	0,23 ± 0,09	0,26 ± 0,12		0,94 ± 0,32	0,96 ± 0,31	
22:6n-3	NLP	0,34 ± 0,11	0,30 ± 0,20		0,36 ± 0,14	0,32 ± 0,21		3,2 ± 0,79	2,8 ± 0,64	↑↑↑
	HLP	0,35 ± 0,13	0,31 ± 0,15		0,34 ± 0,31	0,36 ± 0,23		3,0 ± 1,2	3,0 ± 1,0	
Σ SFA	NLP	14 ± 1,6	16 ± 4,4	↓↓↓	29 ± 4,2	34 ± 6,8	↓↓↓	42 ± 2,5	43 ± 2,5	↓
	HLP	14 ± 1,5	17 ± 4,5	↓↓↓	33 ± 4,5	32 ± 4,3		45 ± 4,0	44 ± 2,4	↑
Σ MFA	NLP	24 ± 2,9	24 ± 2,3		49 ± 4,9	47 ± 5,1	↑↑↑	14 ± 1,5	15 ± 1,7	↓
	HLP	28 ± 4,9	27 ± 4,1	↑	49 ± 3,4	50 ± 3,3		15 ± 2,1	16 ± 2,3	
Σ n-6 PUFA	NLP	61 ± 3,7	59 ± 5,0	↑	20 ± 4,9	18 ± 5,3	↑	38 ± 2,6	37 ± 2,6	↑↑↑
	HLP	56 ± 5,4	55 ± 7,0		17 ± 4,3	17 ± 4,4		35 ± 4,9	35 ± 3,5	
Σ n-3 PUFA	NLP	1,6 ± 0,38	1,4 ± 0,39	↑↑↑	2,0 ± 0,61	1,8 ± 0,62	↑	5,3 ± 1,2	4,7 ± 0,93	
	HLP	1,7 ± 0,46	1,5 ± 0,48	↑	1,8 ± 0,72	1,8 ± 0,62		5,1 ± 1,7	5,3 ± 1,6	↑↑↑

^a - ↓ - $P < 0,05$, ↓↓ - $P < 0,01$, ↓↓↓ - $P < 0,001$ Studentův t-test, směr šipky udává charakter změny

^b - $n = 59$ pro všechny lipidové třídy, ^c - $n = 92$ pro všechny lipidové třídy, Označení mastných kyselin viz Tab. 1.1.1.

Tabulka 3.1.1.2.2 Příspěvek methylačního kroku k celkové chybě metody

mastná kyselina	Fosfolipidy			Triacylglyceroly		
	Mol% ^a	ME ^b	GC ^c	Mol% ^a	ME ^b	GC _c
12:0	0,01 ± 0,00	2,7	3,34	0,01 ± 0,00	12	5,1
14:0	0,23 ± 0,02	10	0,58	1,7 ± 0,04	2,7	0,31
16:0	28 ± 0,33	1,2	0,17	25 ± 0,10	0,41	0,15
16:1n-9	0,16 ± 0,01	7,7	1,13	0,80 ± 0,01	1,2	0,50
16:1n-7	0,57 ± 0,01	2,0	0,49	3,9 ± 0,02	0,51	0,35
18:0	14 ± 0,08	0,60	0,14	3,6 ± 0,06	1,7	0,16
18:1n-9	10 ± 0,05	0,48	0,12	40 ± 0,15	0,31	0,22
18:1n-7	2,0 ± 0,02	0,79	0,61	3,0 ± 0,11	2,4	2,3
18:2n-6	23 ± 0,07	0,34	0,06	17 ± 0,09	0,59	0,08
18:3n-6	0,08 ± 0,01	10	2,56	0,34 ± 0,00	1,0	0,53
18:3n-3	0,25 ± 0,02	7,5	1,24	1,1 ± 0,01	1,0	0,16
20:0	0,09 ± 0,00	2,6	2,99	0,06 ± 0,00	3,0	2,1
20:1n-9	0,19 ± 0,01	1,7	2,29	0,39 ± 0,01	1,78	0,92
20:2n-6	0,42 ± 0,01	3,0	0,99	0,23 ± 0,01	4,1	1,6
20:3n-6	3,2 ± 0,03	0,90	0,21	0,28 ± 0,01	3,0	0,81
20:4n-6	12 ± 0,10	0,90	0,15	1,3 ± 0,03	2,3	0,27
20:5n-3	0,93 ± 0,01	0,90	0,37	0,27 ± 0,00	1,5	0,82
22:4n-6	0,35 ± 0,00	1,4	0,45	0,16 ± 0,00	0,96	0,96
22:5n-6	0,23 ± 0,00	1,3	0,57	0,09 ± 0,00	2,6	0,92
22:5n-3	0,92 ± 0,01	1,4	0,34	0,35 ± 0,01	1,8	1,1
22:6n-3	3,6 ± 0,05	1,4	0,41	0,59 ± 0,02	2,7	0,76
Σ SFA	42 ± 0,29	0,71	0,10	31 ± 0,14	0,45	0,14
Σ MFA	13 ± 0,05	0,43	0,10	48 ± 0,09	0,20	0,05
Σ PUFA n-6	39 ± 0,20	0,55	0,07	19 ± 0,13	0,73	0,11
Σ PUFA n-3	5,8 ± 0,08	1,4	0,35	2,3 ± 0,03	1,4	0,35

^a – aritmetický průměr ± SD, ^b – RSD methylačního kroku, ^c – RSD plynové chromatografie

Příspěvky jednotlivých kroků k celkové chybě metody, které byly naměřeny na šesti vzorcích plasmy, jsou ukázány v tabulkách 3.1.1.2.3 a 3.1.1.2.4. Výsledky vyjádřené v molárních procentech jsou pro porovnání profilů mastných kyselin u stejného jedince ve VLDL a LDL pohodlnější. Jak lze předpokládat, příspěvek GC k celkové chybě je nejmenší. Tyto výsledky jsou ve shodě s nálezy Edera a spolupracovníků³⁴², kteří se zaměřili na analýsu standardní směsi za podmínek splitless injekce. Příspěvek extrakce, tenkovrstvé chromatografie a methylačního kroku byl podobný. Obecně RSD jakékoli procedury je nepřímou závislé na zastoupení mastné kyseliny (Obr. 3.1.1.2.1), minoritní mastné kyseliny jsou někdy eluovány blízko nečistot pocházejících ze vzorku, případně z materiálu tenké vrstvy³⁷⁸ a výsledné obtíže při integraci se v hodnotě RSD odrazí.

Tabulka 3.1.1.2.3 Příspěvek jednotlivých kroků k celkové chybě metody – fosfolipidy

mastná kyselina	VLDL			LDL				
	Mol% ^a	Krok V	Krok II – V	Krok I - V ^b	Mol% ^a	Krok V	Krok II – V	Krok I - V ^b
12:0	0,07	3,4	17	16	0,03	5,0	13	22
14:0	0,28	2,04	10	11	0,29	1,5	8,1	12
16:0	27	0,54	1,6	2,2	29	0,39	1,1	1,4
16:1n-9	0,19	5,6	11	8,4	0,16	3,5	11	9,6
16:1n-7	0,56	2,2	5,5	5,8	0,54	1,8	3,2	4,2
18:0	15	0,34	1,1	2,1	14	0,32	0,76	2,0
18:1n-9	11	0,55	3,0	2,5	11	0,26	0,73	1,0
18:1n-7	2,0	0,85	1,8	2,5	2,1	0,93	1,2	1,6
18:2n-6	22	0,21	0,84	1,3	22	0,24	0,72	0,67
18:3n-6	0,13	5,6	8,5	9,8	0,09	4,3	8,7	8,6
18:3n-3	0,62	2,8	5,2	6,4	0,32	3,1	3,8	8,3
20:0	0,11	7,8	8,7	6,9	0,09	5,5	4,2	7,2
20:1n-9	0,20	4,9	4,0	3,7	0,18	3,7	3,3	3,7
20:2n-6	0,79	3,2	7,1	14	0,62	2,8	6,3	13
20:3n-6	3,5	1,7	1,9	2,4	3,3	0,5	1,2	1,5
20:4n-6	11	0,68	2,1	4,2	10	0,38	1,5	2,1
20:5n-3	0,82	1,1	2,0	3,3	0,85	0,66	2,0	1,8
22:4n-6	0,38	1,5	5,0	2,1	0,34	1,5	1,5	3,1
22:5n-6	0,23	2,2	2,3	4,4	0,21	1,7	2,4	3,6
22:5n-3	0,9	1,5	1,9	3,7	0,90	1,2	1,9	2,6
22:6n-3	3,1	1,3	2,3	4,8	2,9	0,9	2,4	2,9
Σ SFA	43	0,39	1,0	1,5	44	0,2	0,7	0,7
Σ MFA	14	0,56	2,8	2,1	14	0,3	0,7	0,8
Σ PUFA n-6	38	0,36	0,8	1,6	38	0,2	0,7	0,8
Σ PUFA n-3	5,4	1,1	2,9	3,6	5,0	0,8	1,9	2,7

^a – aritmetický průměr hodnot po všech krocích ^b – viz text

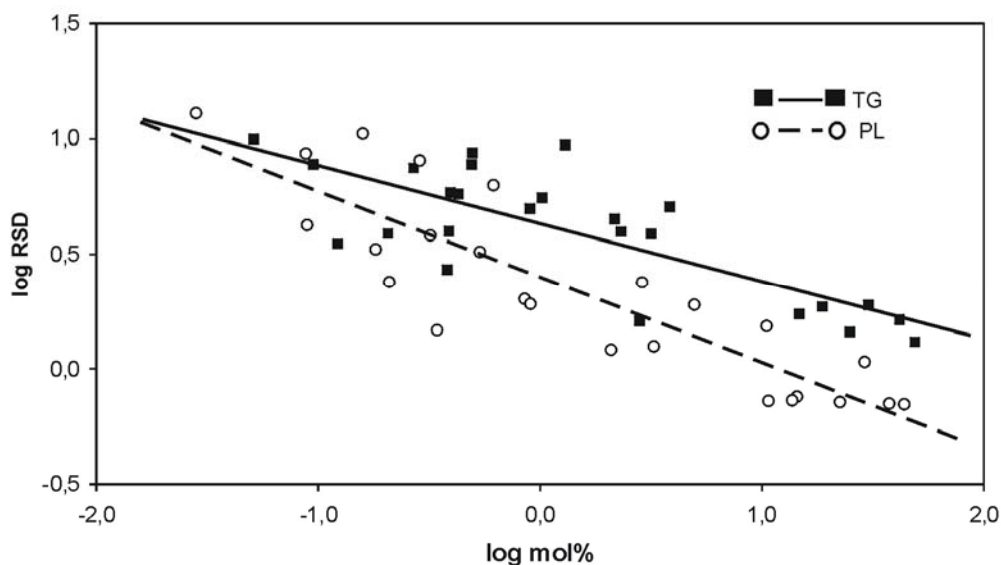
Obsah šesti vybraných mastných kyselin, PA, SA, OA, LA, AA a DHA, vyjádřených jako poměry molárních procent ve LDL/VLDL, je ukázán v Tab. 3.1.1.2.5. Výsledky potvrzují vysokou míru variability mezi jedinci a mezi lipoproteiny. Tyto rozdíly se zvyšují s délkou řetězce mastné kyseliny, stupněm nenasycenosti a u HLP vzorků jsou ještě více prohloubeny. Výrazně zvýšený obsah AA a DHA u některých jedinců byl popsán Gottem a Pownallem³⁷⁷ a Jensenem³⁷⁹. Podobné rozdíly pozorovali Devitt and Headon v subfrakcích HDL₂ a HDL₃³⁷⁶.

Tabulka 3.1.1.2.4 Příspěvek jednotlivých kroků k celkové chybě metody - triacylglyceroly

mastná kyselina	VLDL				LDL			
	Mol% ^a	Krok V	Krok II - V	Krok I - V ^b	Mol% ^a	Krok V	Krok II - V	Krok I - V ^b
12:0	0,02	5,8	13	18	0,05	2,8	10	10
14:0	1,7	0,55	10	6,8	1,3	0,44	9,4	5,7
16:0	26	0,21	0,85	1,4	25	0,17	1,4	2,3
16:1n-9	0,77	0,63	2,8	1,2	0,90	0,84	5,0	5,4
16:1n-7	3,8	0,35	2,1	1,6	3,2	0,35	3,9	4,0
18:0	3,2	0,42	1,9	2,1	3,8	0,39	5,1	4,2
18:1n-9	41	0,13	1,2	0,49	42	0,12	1,6	0,9
18:1n-7	3,2	0,73	1,8	1,1	2,8	0,64	1,6	2,6
18:2n-6	15	0,12	1,2	1,4	15	0,12	1,7	1,8
18:3n-6	0,30	0,89	5,5	3,7	0,39	0,86	5,9	6,2
18:3n-3	1,1	0,39	5,9	4,0	1,0	0,83	5,6	6,2
20:0	0,07	4,5	9,4	10	0,10	5,0	7,8	12
20:1n-9	0,34	3,5	4,2	0,80	0,38	1,9	2,7	3,1
20:2n-6	0,35	2,1	9,1	13	0,49	3,6	8,7	19
20:3n-6	0,30	1,6	4,1	4,9	0,43	1,9	5,8	7,4
20:4n-6	1,2	0,46	8,5	5,2	2,3	0,63	4,0	9,3
20:5n-3	0,16	1,5	4,6	7,0	0,27	1,9	7,5	9,2
22:4n-6	0,15	2,0	2,0	3,0	0,21	2,5	3,9	4,2
22:5n-6	0,09	2,7	2,9	4,3	0,12	2,3	3,5	4,7
22:5n-3	0,34	1,2	2,9	4,3	0,39	1,5	4,0	5,8
22:6n-3	0,44	1,1	3,9	5,4	0,49	1,5	7,8	7,4
Σ SFA	31	0,19	1,1	1,5	30	0,16	1,9	2,5
Σ MFA	49	0,08	0,87	0,44	49	0,10	1,3	0,95
Σ PUFA n-6	18	0,15	1,4	1,9	19	0,18	1,9	3,1
Σ PUFA n-3	2,0	0,51	4,5	4,6	2,2	0,68	4,5	6,0

^a – aritmetický průměr hodnot po všech krocích ^b – viz text

Obrázek 3.1.1.2.1 Závislost RSD na molárním obsahu analyzované mastné kyseliny



Výsledky v tabulce 3.1.1.2.1 naznačují, že současné analýsy profilu mastných kyselin v plasmě a LDL nejsou nutné, protože rozdíly v zastoupení mastných kyselin jsou

porovnatelné se standardními odchylkami. Pro metabolické studie je vhodnější zkoumat zastoupení mastných kyselin v separovaných lipoproteinových třídách. Z analytického hlediska duplikované analýzy lze jen doporučit.

Tabulka 3.1.1.2.5 Zastoupení vybraných mastných kyselin ve vzorcích LDL vztaženo na hodnoty ve VLDL

Vzorek	Lipidová třída	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6	20:4n-6	22:6n-3
NLP 1	TAG	98 ± 1,4	120 ± 4,7****	104 ± 0,50***	91 ± 0,76****	152 ± 25****	95 ± 2,0***
	PL	111 ± 0,91****	96 ± 1,8****	98 ± 2,1	104 ± 0,20****	91 ± 3,4****	88 ± 3,6****
NLP 2	TAG	96 ± 3,1****	124 ± 1,5****	103 ± 0,13****	93 ± 4,1****	192 ± 11****	108 ± 16**
	PL	107 ± 0,28*	95 ± 0,04****	98 ± 1,4*	105 ± 0,36****	95 ± 1,1	97 ± 0,30
NLP 3	TAG	94 ± 4,9****	113 ± 7,9****	106 ± 1,4****	96 ± 3,4****	160 ± 20****	97 ± 11
	PL	102 ± 2,1***	98 ± 4,9**	100 ± 1,6	104 ± 0,89****	100 ± 0,47**	93 ± 1,5****
HLP 1	TAG	98 ± 1,4	107 ± 2,0****	106 ± 0,63****	90 ± 0,43****	148 ± 14****	85 ± 7,6****
	PL	111 ± 0,0****	97 ± 1,7	94 ± 0,22*	105 ± 1,0****	92 ± 0,17**	89 ± 1,1***
HLP 2	TAG	88 ± 1,0****	121 ± 12****	100 ± 1,6	104 ± 1,1****	221 ± 19****	158 ± 8,6****
	PL	96 ± 3,8*	103 ± 2,4***	98 ± 0,40	100 ± 1,1	106 ± 5,3*	110 ± 8,4**
HLP 3	TAG	90 ± 1,1****	140 ± 1,0****	96 ± 1,2****	112 ± 0,81****	321 ± 7,6****	165 ± 3,8****
	PL	112 ± 1,4****	86 ± 0,68****	95 ± 0,30***	109 ± 0,64****	90 ± 2,0****	81 ± 2,0****

Hodnoty ($n = 18$) jsou ve formě průměr \pm SD, VLDL = 100%. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$, **** - $P < 0,0001$, t -test na základě molárních procent. HLP – hyperlipidemie, NLP- normolipidemie

3.1.1.3 Porovnání zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech a fosfatidylcholinu sera – Studie III

(výsledky studie nebyly dosud publikovány)

Jednou z nejčastějších aplikací analýsy mastných kyselin je stanovení jejich zastoupení v jednotlivých lipidových třídách (CE, TAG, a PC) krevního sera, popřípadě krevní plasmy. Plasma i serum mají velmi podobné zastoupení mastných kyselin ve všech lipidových třídách³⁸⁰, takže jsou pro potřeby analýsy zastoupení mastných kyselin zaměnitelné.

Jednotlivé lipidové třídy je třeba nejdříve separovat pomocí TLC, přičemž nepolární CE a TAG jsou separovány za použití prakticky nepolární mobilní fáze. Polární lipidy, jejichž majoritním představitelem v krevním seru je PC, zůstávají v nepolárním systému na startu a separují se za použití polární mobilní fáze. Toto je běžný postup při analýse mastných kyselin v lipidech tkání, kde jsou vedle PC přítomny i další PL ve srovnatelném zastoupení. Krevní serum obsahuje vedle PC pouze malá množství sfingomyelinu (SM) a lysofosfatidylcholinu (LPC). Z těchto dvou lipidových tříd je SM značně resistantní vůči chemickým reakcím a nepodléhá transmethylaci za stejných reakčních podmínek jako PC. Koncentrace LPC představuje přibližně 1-7 % koncentrace PC, a proto by při vynechání druhé TLC měly být zjištěny velmi podobné výsledky složení mastných kyselin jako pro separovaný PC.

Cílem studie bylo porovnat složení mastných kyselin v PC a PL ve stejných vzorcích. Pokud by tento rozdíl byl zanedbatelný ve srovnání s rozptylem biologického souboru, bylo by stanovení mastných kyselin v PL krevního sera podstatně výhodnější z časového i ekonomického hlediska a z hlediska pracnosti metody.

Materiál a metody

Výchozím materiálem byly extrakty 3 směsných ser (každý z 8 ml sera). Analýza zastoupení mastných kyselin byla provedena standardním způsobem ([kapitola 2.6.4.1](#)) s tím, že jako PL byl použit start po vyvíjení vzorku pro neutrální lipidy, PC byly izolovány pomocí další TLC.

Výsledky

V [tabulce 3.1.1.3.1](#) je porovnáno zastoupení mastných kyselin v PL a PC u všech tří vzorků. Dále je v této tabulce uvedeno pro porovnání rozpětí hodnot v biologickém souboru³⁸¹.

Tabulka 3.1.1.3.1 Porovnání zastoupení mastných kyselin v PL a PC různých vzorků

Kyselina	vzorek A			vzorek B			vzorek C			klin. soubor *	
	PC	PL	p	PC	PL	p	PC	PL	p	min	max
12:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,0000	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,0023	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,1285	ND	ND
14:0	0,36 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,0000	0,31 ± 0,01	0,36 ± 0,04	0,0000	0,27 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,0009	0,00	0,56
14:1n-5	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,0000	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,0006	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,0000	ND	ND
16:0	30,72 ± 0,50	32,14 ± 0,36	0,0000	31,78 ± 0,45	31,44 ± 0,35	0,0077	33,14 ± 0,55	30,93 ± 0,46	0,0000	21,01	33,10
16:1n-9	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,0000	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,0043	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,0000	ND	ND
16:1n-7	0,72 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,0000	0,74 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,0000	0,93 ± 0,02	0,96 ± 0,03	0,0000	0,13	1,07
18:0	13,04 ± 0,09	13,41 ± 0,10	0,0000	11,86 ± 0,21	11,90 ± 0,12	0,7142	11,07 ± 0,18	11,62 ± 0,14	0,0000	10,35	19,02
18:1n-9	11,18 ± 0,14	11,29 ± 0,08	0,0001	10,71 ± 0,14	10,80 ± 0,08	0,0030	12,85 ± 0,16	12,94 ± 0,20	0,0136	7,63	15,06
18:1n-7	1,91 ± 0,04	1,97 ± 0,02	0,0000	1,94 ± 0,03	1,96 ± 0,01	0,0442	2,38 ± 0,03	2,39 ± 0,02	0,3329	1,26	3,39
18:2n-6	24,52 ± 0,24	23,03 ± 0,13	0,0000	22,11 ± 0,31	21,32 ± 0,13	0,0000	19,90 ± 0,30	19,14 ± 0,11	0,0000	14,59	34,43
18:3n-6	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,8611	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,4030	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,0001	0,00	0,20
18:3n-3	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,0000	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,9777	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,2413	0,00	0,61
20:0	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,0000	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,1314	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,0000	0,03	0,18
20:1n-9	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,0000	0,14 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,0000	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,0000	0,05	0,34
20:2n-6	0,34 ± 0,05	0,34 ± 0,01	0,9875	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,01	0,9856	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,3517	0,23	0,66
20:3n-6	3,33 ± 0,06	2,91 ± 0,04	0,0000	3,40 ± 0,08	3,19 ± 0,04	0,0000	3,46 ± 0,05	3,46 ± 0,02	0,8343	1,16	4,63
20:4n-6	8,68 ± 0,27	8,49 ± 0,11	0,0026	10,62 ± 0,36	10,96 ± 0,12	0,0000	9,25 ± 0,36	10,23 ± 0,11	0,0000	4,67	14,96
20:5n-3	0,76 ± 0,04	0,76 ± 0,02	1,0000	0,79 ± 0,03	0,84 ± 0,01	0,0000	0,89 ± 0,03	1,00 ± 0,02	0,0000	0,00	1,78
22:4n-6	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,1976	0,32 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,0000	0,34 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,0000	ND	ND
22:5n-6	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	1,0000	0,24 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,0000	0,23 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,0000	0,12	0,58
22:5n-3	0,77 ± 0,04	0,73 ± 0,02	0,0000	0,81 ± 0,03	0,89 ± 0,02	0,0000	0,92 ± 0,05	1,10 ± 0,02	0,0000	0,25	1,75
22:6n-3	2,48 ± 0,14	2,50 ± 0,07	0,9954	3,28 ± 0,16	3,84 ± 0,08	0,0000	3,21 ± 0,23	4,13 ± 0,07	0,0000	0,88	5,60
Σsatur	44,18 ± 0,42	46,08 ± 0,32	0,0000	44,00 ± 0,31	43,80 ± 0,28	0,1593	44,54 ± 0,41	42,89 ± 0,57	0,0000	34,63	49,61
Σmono	14,12 ± 0,16	14,41 ± 0,09	0,0000	13,72 ± 0,17	13,91 ± 0,10	0,0000	16,54 ± 0,19	16,67 ± 0,25	0,0003	10,04	18,89
Σn-3	4,26 ± 0,20	4,21 ± 0,10	0,9220	5,13 ± 0,20	5,79 ± 0,10	0,0000	5,25 ± 0,31	6,46 ± 0,11	0,0000	1,86	8,81
Σn-6	37,40 ± 0,23	35,30 ± 0,19	0,0000	37,10 ± 0,23	36,50 ± 0,21	0,0000	33,60 ± 0,26	33,98 ± 0,24	0,0000	30,20	45,97

p - ANOVA post hoc analysis - Scheffého test, ND – nestanoveno; * - Hodnoty min(max) představují průměr zmenšený (zvětšený) o trojnásobek SD, soubor normolipidemických osob, n = 59, hodnoty představují mol% ± SD

Diskuse

Fosfolipidy krevního sera obsahují vedle majoritního PC (60 - 80 mol % ze součtu PL) ještě LPC (2 – 15 mol % ze součtu PL) a SM (15 - 25 mol % ze součtu PL)³⁸², toto se nemění i v pokročilém věku³⁸³. Vzhledem k tomu, že PC obsahuje dva řetězce odvozené od mastné kyseliny, zatímco LPC a SM pouze jeden, je příspěvek mastných kyselin z PC 75 – 90 mol %.

Lysofosfatidylcholin podléhá transmethylační reakci pomocí methanolátu sodného podobně jako PC, SM je naopak vůči této reakci resistentní³⁸⁴. Lysofosfatidylcholin vzniká především působením lecitin:cholesterol acyltransferasy, kdy acyl mastné kyseliny z posice *sn*-2 PC reaguje s cholesterolem za vzniku CE a LPC. Posice *sn*-2 PC je obsazena převážně PUFA, proto LPC obsahuje méně PUFA a více SFA a MFA než PC. Pro SM je charakteristické majoritní zastoupení SFA. Z [tabulky 3.1.1.3.1](#) je patrné, že pro oba typy analys bylo dosaženo významně rozdílných hodnot pro většinu mastných kyselin v PC a PL. Pokud by se uplatňoval vliv LPC a SM, obsahovaly by všechny vzorky PL více SFA a méně PUFA. U vzorku A, kde se lišilo zastoupení mastných kyselin mezi PC a PL plasmy u LA a SA, se tak ve výsledku snížilo zastoupení sumy n-6 PUFA a zvýšilo zastoupení SFA ve vzorku PL oproti PC. Obdobnou relaci pozoroval Conquer u plasmy³⁸³ pro saturevané kyseliny, kdy pro PL bylo zastoupení vyšší (44 mol%) vs. PC (42 mol%), a n-6 PUFA, kde byl pozorován opačný trend. U ser B a C se ale tyto rozdíly nepotvrdily, v každém ze tří ser jde tedy o odlišné mastné kyseliny a nejedná se tak o systematický rozdíl. Pozorované vysoké signifikance rozdílů mezi PC a PL jsou tedy důsledkem opakovaných analys s malým rozptylem.

Srovnáním s rozpětím hodnot v biologickém souboru jsou rozdíly v zastoupení mastných kyselin mezi PC a PL zanedbatelné, jak je opět patrné z [tabulky 3.1.1.3.1](#).

Závěr

Z uvedených výsledků je patrné, že při vyšetření profilu mastných kyselin v PC krevního sera je možno nahradit PC celkovým PL. Tato náhrada znamená značnou časovou i materiální úsporu, zvláště při srovnávání velkých klinických souborů a rutinním vyšetřování pro diagnostické účely.

3.1.2 Analýza sterolů – studie IV

(výsledky této kapitoly nebyly dosud publikovány)

3.1.2.1 Vliv nástříku a následné derivatisace

V klinické praxi se GC analýza sumy volných a esterifikovaných sterolových molekul nejčastěji provádí z nezmýdelnitelného podílu plasmy anebo sera. Zmýdelněním (alkalickou hydrolysou) se totiž dosáhne štěpení acylesterové vazby v molekule steryl esteru, přičemž vázaná molekula sterolu je převedena na volný sterol a tedy neodlišitelná od původně přítomných molekul neesterifikovaných sterolů. Pokud má analýza rozlišit mezi volnou a esterifikovanou formou sterolu, musí se do analytického procesu vřadit vhodný separační krok, například TLC nebo HPLC.

Volné steroly (spolu s jinými lipidovými třídami, které nepodléhají hydrolyse za alkalických podmínek, protože neobsahují O-acyl vazbu, jako například sfingolipidy) se tak dají extrahovat nepolárním rozpouštědlem z nezmýdelnitelného podílu a stanovit přímo³⁸⁵ nebo po následné derivatisaci na acetylované³⁸⁶, benzojlované³⁸⁷ nebo trimethylsilylované³⁸⁸ sloučeniny. Zanedbatelné množství přítomných steryl glykosidů (jednotky ng/l)³⁸⁹ i cholesteryl sulfát (1-2 mg/l)³⁹⁰ preferuje při extrakci polární fázi, navíc molekuly sfingolipidů přítomné v nepolární fázi neinterferují se stanovením sterolů.

Materiál a metody

V rámci optimalisace analytického procesu byl postupně prozkoumány některé kroky analýsy necholesterolových sterolů:

1. Možnost analýsy vzorku jako volných sterolů nebo jejich acetylovaných derivátů
2. Typ nástříku vzorku do kolony technikou split nebo splitless

V pokusech byly analysovány kalibrační směsi jak pro necholesterolové steroly, tak pro cholesterol (postup viz kapitoly 2.2, 2.6.4.3.2, 2.6.4.3). Příklad analýsy ekviváhové směsi dostupných standardů je na obrázku 3.1.2.1.

Jako modelový vzorek pro zkoumání podmínek acetylce byla zvolena směs cholesterolu a uhlovodíku 5 α -cholestanu (I.S._{CH}). 5 α -cholestan za podmínek acetylce přechází kvantitativně do nepolární fáze, takže v ideálním případě bude poměr cholesterolu a I.S._{CH} nejvyšší. Ze zásobních roztoků cholesterolu a I.S._{CH} byl vytvořen směsný roztok a podroben acetylaci (kapitola 2.6.4.2).

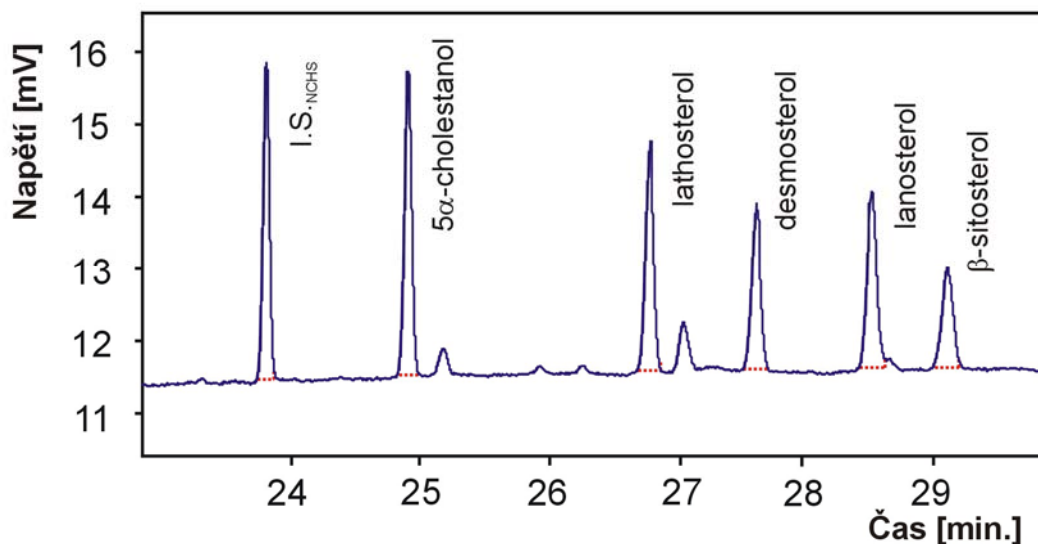
Výsledky

Acetylce

Vliv teploty a času acetylce na směs cholesterolu a vnitřního standardu udává [tabulka](#)

3.1.2.1. Jako nejvýhodnější postup se ukázalo ponechání acetylační směsi při laboratorní teplotě po dlouhou dobu (24 h). Výtěžek pro cholesteryl acetát sice není nejvyšší, ale takto nastavené parametry vykazují nejvyšší míru reprodukovatelnosti (RSD 2 %) při vysokém výtěžku. Zahřátí acetylované směsi je na úkor reprodukovatelnosti i výtěžku metody.

Obr. 3.1.2.1 Analýza ekvívahové směsi standardů



Nástřík 2 μ l, podmínky analýzy viz kapitola 2.6.4.2

Tabulka 3.1.2.1 Acetylace směsi cholesterol a I.S._{CH}

teplota [°C]	čas [min]	Poměr CH/I.S. _{CH}			teplota [°C]	čas [min]	Poměr CH/I.S. _{CH}		
		průměr	SD	RSD			průměr	SD	RSD
25	1440	2,29	0,04	1,95	60	30	1,93	0,07	3,88
25	60	2,66	0,61	23,00	60	60	2,26	0,17	7,48
25	120	2,35	0,11	4,53	80	10	1,87	0,52	27,63
25	180	1,75	0,04	2,54	80	30	1,69	0,62	36,37
60	10	1,08	0,45	41,67	80	60	1,63	0,50	30,34

Vzorky byly naředěny na 30 μ l acetonem, nástříkový objem byl 2 μ l. Data jsou vždy z trojic opakovaných měření. Podmínky analýzy viz kapitola 2.6.4.2.

Split a splitless nástřík

Porovnání kalibračních závislostí je přehledně znázorněno v tabulkách 3.1.2.2 a,b,c. V tabulkách je porovnán vliv typu nástříku, derivatisace a u nástříkové techniky splitless i délka nástříkové jehly. Nástříkové objemy byly zvoleny tak, aby do analytického systému přecházelo přibližně stejné množství vzorku (podobné plochy peaků pro I.S.-NCHS.).

Z tabulek je patrné, že acetylované deriváty sterolů mají vyšší hodnotu směrnic pro lineární kalibrační křivky a tedy jsou vhodnější pro kvantitativní analýsu, porovnání regresních přímk s přímkou pro acetylovaný derivát injikovaný technikou split je v tabulkách znázorněno. Až na jedinou výjimku (volný β -sitosterol injikovaný technikou split) má tato

závislost statisticky výrazně vyšší směrnici než jiná analytická uspořádání. Porovnání techniky split a splitless stejným kritériem vychází příznivěji pro techniku split (data neuvedena).

Tabulka 3.1.2.2a 5 α -cholestanol: kalibrační závislosti pro různé techniky nástřiku a zpracování vzorku

	Regresní rovnice	R	typ nástřiku	P1	P2
acetylované deriváty sterolů	$1,0179x + 0,0084$	0,9998	split		
	$0,9502x + 0,0347$	0,9985	splitless 5 cm	< 0,01	< 0,01
	$0,9765x + 0,0077$	0,9998	splitless 7 cm	< 0,001	< 0,0001
volné steroly	$0,9862x + 0,0044$	0,9999	split	< 0,001	< 0,001
	$0,9502x + 0,0347$	0,9985	splitless 5 cm	< 0,001	< 0,001
	$0,8959x + 0,0100$	0,9996	splitless 7 cm	< 0,0001	< 0,0001

Podmínky nástřiku – split 2,0 μ l; splitless 0,2 μ l po dobu 1,0 min, další podmínky viz kapitola 2.6.4.2; R – Pearsonův koeficient korelace, n = 8; 5 cm, 7 cm – délka jehly při splitless nástřiku, P1 – rovnoběžnost přímky, P2 – totožnost přímky vs. regresní přímka pro acetylovaný derivát s nástřikem split

Tabulka 3.1.2.2b Lathosterol: kalibrační závislosti pro různé techniky nástřiku a zpracování vzorku

	Regresní rovnice	R	typ nástřiku	P1	P2
acetylované deriváty sterolů	$0,9329x + 0,0097$	0,9998	split		
	$0,8768x + 0,0010$	0,9998	splitless 5 cm	< 0,0001	< 0,0001
	$0,8956x + 0,0031$	0,9996	splitless 7 cm	< 0,01	< 0,0001
volné steroly	$0,9111x + 0,0023$	0,9999	split	< 0,01	< 0,0001
	$0,8387x + 0,0327$	0,9985	splitless 5 cm	< 0,0001	< 0,0001
	$0,8298x + 0,0045$	0,9999	splitless 7 cm	< 0,0001	< 0,0001

Zkratky a vysvětlení symbolů viz tabulka 3.1.2.2a

Tabulka 3.1.2.2c β -sitosterol: kalibrační závislosti pro různé techniky nástřiku a zpracování vzorku

	Regresní rovnice	R	typ nástřiku	P1	P2
acetylované deriváty sterolů	$0,6340x + 0,0301$	0,9987	split		
	$0,5752x + 0,0076$	0,9985	splitless 5 cm	< 0,001	< 0,0001
	$0,5851x + 0,0016$	0,9995	splitless 7 cm	< 0,001	< 0,0001
volné steroly	$0,6349x + 0,0045$	0,9995	split	NS	< 0,05
	$0,5258x + 0,0107$	0,9985	splitless 5 cm	< 0,0001	< 0,0001
	$0,5392x + 0,0555$	0,9960	splitless 7 cm	< 0,001	< 0,0001

Zkratky a vysvětlení symbolů viz tabulka 3.1.2.2a

Po provedení optimalisace metody podle parametrů zjištěných výše se analytický systém nakalibruje i na další necholesterolové steroly (desmosterol, lanosterol). Výsledek analýsy klinického vzorku za takto nastavených podmínek je znázorněn na obrázku 3.1.2.2 na str. 75.

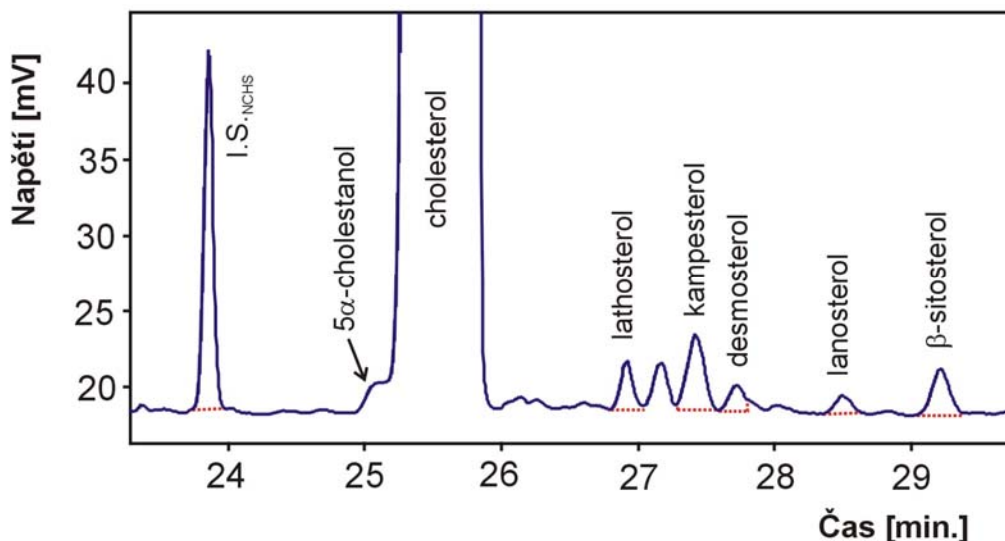
Diskuse

Acetylace

Derivatisace sterolové molekuly vede ke snížení polaritě a tedy za podmínek GC i ke zkrácení elučních časů a zlepšení tvaru peaku³⁹¹. Jistou daní za zlepšení podmínek GC analýsy je zvýšení pravděpodobnosti koeluce kritických peaků, například 5 α -cholestanolu a cholesterolu³⁸⁶. Acetylované deriváty sterolů mají vyšší odezvu než volné steroly, protože mají vyšší počet aktivních uhlíků v molekule a díky nižší polaritě menší ztráty

chromatografickým procesem. Volné steroly mohou mít také nižší odezvu díky dehydratačním a adsorpčním jevům v systému³⁸⁶.

Obr. 3.1.2.2 Příklad analýzy klinického vzorku



Nástřik 2 μ l, podmínky analýzy viz kapitola 2.6.4.2

Technika nástřiku split a splitless

Steroly i jejich deriváty mají vysoké body rozkladu (steroly se rozkládají při teplotách okolo 350 °C, jejich deriváty při nižších teplotách) a nemohou tedy přejít do kolony v plynném stavu, ale zřejmě ve formě aerosolu. Za stejných podmínek split i splitless nástřiku tedy nedojde k diskriminaci výševroucích složek vzorku sterolů. Při průchodu molekuly sterolu analytickým systémem může dojít k přesmykům dvojných vazeb, nebo dokonce k jejich vytváření, např. 5 α -cholesta-5,8-dien-3 β -ol vytváří další dvojnou vazbu a je tak při nástřicích do horkého injektoru termolabilní a tedy nekvantifikovatelný³⁹² nebo dojde k dekompozičním nebo isomerizačním modifikacím molekuly při průchodu kolonou, takže peaky nerespektují gaussovskou distribuci³⁹³.

Jako typ nástřiku byl pro další analýzy zvolen split, protože vykazoval obecně vyšší hodnoty směrnice než splitless (tabulky 3.1.2.2 a,b,c), navíc u klinických vzorků byla v některých splitless analýsách pozorována tvorba „ghost“ peaků interferujících se stanovením β -sitosterolu. Tyto peaky se objevují po nástřiku při dlouhodobém průchodu nosného plynu injektorem a tedy existuje vyšší možnost desorpce látek z injektoru nebo kolony z předchozích analýs³⁹⁴. Pro danou konfiguraci injektoru za splitless podmínek jsme neprokázali rozdílné chování nástřikovaného vzorku při nástřiku 7 cm a 5 cm jehlou.

Závěr

Pro analýzy sterolů byla dána přednost acetylaci pro výhodnější analytické podmínky.

Jako nejvýhodnější postup acetylace se ukázalo ponechání acetylační směsi při laboratorní teplotě po dlouhou dobu (24 h). Zahřátí směsi je na úkor reprodukovatelnosti i výtěžku metody. Jako typ nástřiku byl zvolen split, protože vykazoval obecně vyšší hodnoty směrnic kalibračních závislostí než nástřik splitless, navíc u klinických vzorků byla v některých splitless analysách pozorována tvorba „ghost“ peaků. Vzorek pro analysy sterolů se choval stejně při nástřiku 7 cm a 5 cm jehlou a dané konfiguraci injektoru za splitless podmínek.

3.1.2.2 Současné stanovení celkového cholesterolu a necholesterolových sterolů

Možnost stanovení cholesterolu pomocí plynové chromatografie je známa už od počátku 60.let minulého století, stanovení necholesterolových sterolů pomocí plynové chromatografie má o několik let kratší tradici^{395,396}. Podmínky pro současné stanovení všech sterolů musí respektovat vlastnosti analytické matrice, v případě klinických vzorků obsah sterolů v lidské plasmě (seru).

Materiál a metody

Kalibrace chromatografického systému byly provedena zvlášť pro stanovení cholesterolu a necholesterolových sterolů (kapitola 2.2), vzorky plasmy byly získány ze studií pro nutriční poruchy (kapitola 2.5). Analysy pomocí plynové chromatografie byly porovnány s klasickou enzymaticko-kolorimetrickou metodou stanovení celkového cholesterolu (kapitola 2.6.1). Protože další úpravy metodických postupů vyžadovaly automatické změny měřicích parametrů plynového chromatografu, byl v této studii používán také plynový chromatograf Shimadzu GC-17 s automatickým injektorem AOC-20i a automatickým řízením citlivosti detektoru.

Výsledky

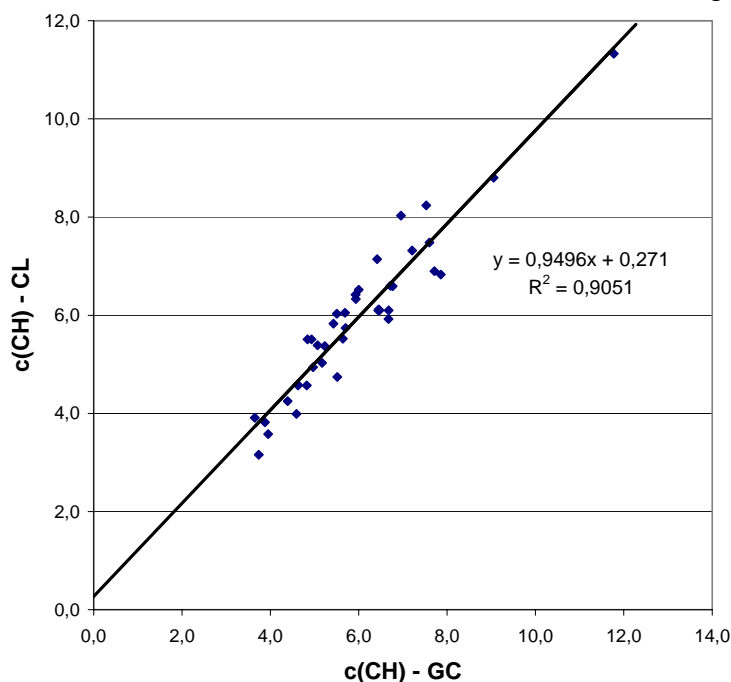
Analytický systém byl nejdříve nakalibrován zvlášť pro cholesterol a pro necholesterolové steroly. Graf 3.1.2.3 znázorňuje korelaci stanovení cholesterolu pomocí GC s enzymatickou metodou.

Pro kalibraci systému na současné stanovení cholesterolu a necholesterolových sterolů byla použita stejná konfigurace metody jako pro analysu necholesterolových sterolů (kapitola 2.6.4.2) s tím, že analysy probíhaly na plynovém chromatografu Shimadzu.

Pro potřebu dalšího textu nyní zavedeme pojem *n % overload kolony* danou látkou jako takovou analysu, při které na chromatografickém záznamu při nejvyšší citlivosti detektoru dosahuje výška peaku dané látky *n %* měřeného rozsahu (tj. při výšce peaku 1250 mV a rozsahu 1250 mV je 100% overload), daná látka je separována až na základní linii záznamu a už při této citlivosti peaky vykazují vysokou asymetrii („fronting“). Při nižších hodnotách overloadu (cca 20 %) je závislost odezvy detektoru lineární a reprodukovatelná³⁹³. Pro

potřeby našich analys ale potřebujeme dosáhnout lineární a reprodukovatelné závislosti i pro vyšší hodnoty overloadu (až 100 %), abychom mohli kvantifikovat minoritní steroly. Nutnou podmínkou pro linearitu (případně i jinou závislost) kalibračních vztahů je reprodukovatelnost jednotlivých bodů kalibrace, kterou lze snadno zjistit opakovanými nástřiky zvolených bodů kalibrace. Pokud toto neplatí, nemá význam dále pokračovat v analysách kalibračních závislostí, neboť nemáme zaručen spolehlivý kalibrační vztah. Závislost reprodukovatelnosti nástřiku na hodnotě % overloadu je znázorněna v [Grafu 3.1.2.4](#).

Graf 3.1.2.3 Korelace stanovení celkového cholesterolu pomocí GC a enzymatickou metodou



$n = 48$, Pearsonův koeficient korelace R^2 , CL – enzymatické stanovení, GC – stanovení pomocí plynové chromatografie (podmínky viz kapitola 2.6.4.3)

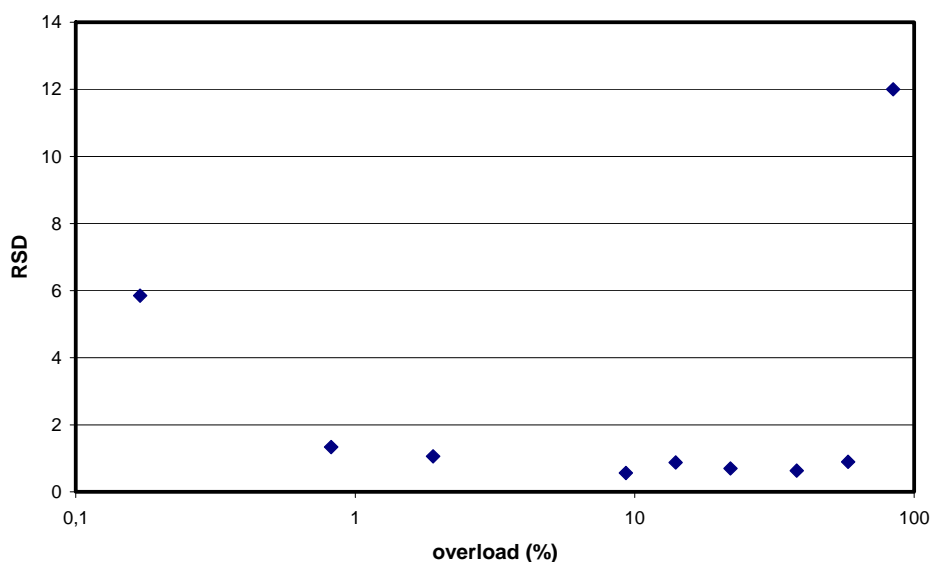
U hodnot velmi malých je RSD vysoké díky šumu detektoru, který do hodnot ploch peaků přispívá nezanedbatelnou měrou. V rozsahu 0,2 – 70% overloadu je RSD pod akceptovatelnou hodnotou 2 %, ale pro vyšší hodnoty overloadu se dramaticky zvyšuje (pro 100% overload je hodnota RSD v řádu desítek procent). V pásmu od 70 % overloadu výše při maximální citlivosti detektoru se tedy nelze spoléhat na reprodukovatelnost jednotlivých analys a tím méně i na kalibrační závislosti.

Diskuse

Stanovení celkového cholesterolu pomocí GC a pomocí klasických enzymaticko-kolorimetrických metod obecně vykazuje vysokou míru korelace, Kuksis³⁹⁷ našel pro koncentrační rozpětí 2,5-13 mmol/l hodnotu $R^2 = 0,9677$ (pro $n = 197$), v této studii byl nalezen korelační koeficient sice nižší ($R^2 = 0,9051$; $n = 48$), nicméně obě korelační závislosti

jsou vysoce významné ($P < 0,0001$). Enzymatické stanovení založené na oxidaci cholesterolu cholesterol oxidasou ovšem nerozlišuje mezi cholesterolem a jinými necholesterolovými steroly, což může vést k chybné diagnóze u sitosterolemie (zvýšené koncentrace β -sitosterolu i kampesterolu) nebo cerebrotendinosní xanthomatosy (zvýšená koncentrace 5α -cholestanolu)³⁹⁸.

Graf 3.1.2.4 Reprodukovatelnost nástřiku a overload kolony



$n = 5$ pro každý bod, podmínky analýzy viz kapitola 2.6.4.3, nástřikový objem byl vždy $1 \mu\text{l}$, RSD je stanoveno z poměru plochy peaků cholesterolu a $I.S._{CH}$. Plocha peaku $I.S._{CH}$ se pohybovala pro každou analýzu okolo 200 mV.s .

Pro stanovení cholesterolu i necholesterolových sterolů pomocí plynové chromatografie jsou teoreticky tyto možnosti:

1. Stanovení pomocí jednoho vnitřního standardu v rámci jediné analýzy
 - 1a. Využití celého rozsahu detektoru při jedné citlivosti

Pokud bychom chtěli provést integraci jak cholesterolu, tak i necholesterolových sterolů z jednoho záznamu, musíme tak učinit ze záznamu analýzy necholesterolových sterolů, protože absolutní hodnoty ploch pro tyto steroly musí být větší než mez stanovitelnosti (odpovídající ploše cca 15 mV.s). Výšky peaků cholesterolu jsou v těchto analýzách velmi blízko hraniční hodnotě pro sběr dat ($1000\text{--}1250 \text{ mV}$), někdy jej dokonce překročí. Porovnání těchto hodnot s hodnotami získanými z enzymatického stanovení cholesterolu nedává dobré výsledky (data neuvedena). Důvod je zřejmě nereprodukovatelnost analýs v oblastech blízkých 100% overloadu (viz Graf 3.1.2.4).

- 1b. Snížení citlivosti detektoru u časového okna pro cholesterol

Časově omezené snížení citlivosti detektorů se musí vyrovnat s bezpodmínečným

splněním dvou podmínek. První je přesná reprodukovatelnost retenčních časů měřených složek. Druhá podmínka je přesné definování poměrů kroků omezení citlivosti detektoru. Snížení citlivosti ovšem neřeší vlastní množství vzorku vstupující do kolony, tzn. zahlcení kolony a z toho vyplývající negaussovský peak a také možnou nelinearitu odpovědi detektoru.

2. Stanovení pomocí dvou vnitřních standardů v rámci jediné analýsy

Metoda dvou vnitřních standardů při jediné chromatografické analýze naráží na obdobné problémy jako kvantifikace pomocí jediného vnitřního standardu. Robustnost metody bude sice vyšší, pokud pro stanovení cholesterolu zvolíme koncentraci příslušného vnitřního standardu v pásmu 10 – 50% overloadu kolony, ale stejně narazíme na nereprodukovatelnost ploch peaků cholesterolu. Nepomůže (viz bod 1b) ani snížení citlivosti detektoru.

3. Stanovení pomocí dvou vnitřních standardů ve dvou analýsách

Kombinace dvou vnitřních standardů a dvou analýs při různém ředění vylučuje problémy s overloadem kolony. Jako vnitřní standard pro porovnávání s peakem cholesterolu byl zvolen uhlovodík 5 α -cholestan (I.S._{CH}), který je eluován v dostatečném předstihu před cholesterolem, takže neinterferuje ani s peakem cholesterolu, ani s peakem vnitřního standardu pro stanovení necholesterolových sterolů (I.S._{NCHS}, epikoprostanol).

Závěr

Pro současné stanovení cholesterolu a minoritních sterolů, zejména lathosterolu, kampesterolu a β -sitosterolu během jediné analýsy pomocí plynové chromatografie je nutné splnit několik podmínek. Ty vycházejí jednak z konfigurace analytického systému a jednak z požadavků matrice. Analytická metoda, která by všechny tyto podmínky splňovala, postrádá dostatečnou robustnost a proto byl zvolen přístup dvou standardů kombinovaný s dvojím ředěním, tedy dvě chromatografické analýsy.

3.1.2.3 Vliv jednotlivých kroků analýsy na chybu stanovení

Analýsa necholesterolových sterolů pomocí plynové chromatografie je časově a materiálově méně náročná než analýsa mastných kyselin, nicméně metodický postup vyžaduje provedení několika kroků, jež mohou různým dílem přispívat k celkové chybě metody. Materiálem pro analýsu bývá plasma nebo serum, v nichž je přítomen cholesterol v řádově tisícinásobném nadbytku oproti ostatním sterolům, které jsou předmětem zkoumání. Přítomnost jedné složky ve vysoké koncentraci může mít negativní vliv na analytické zpracování i vlastní chromatografickou analýsu, a proto byl v této kapitole zkoumáno, v kterém kroku je analýsa zatížena největší chybou.

Materiál a metody

Jako analytický materiál jsme použili směsné serum získané od pacientů lipidové ambulance IV. interní kliniky 1. LF UK. Vzorky byly analysovány podle postupu pro stanovení necholesterolových sterolů jako acetátů uvedeného v kapitole 2.6.4.2. Vzorek byl zmýdlen ve čtyřech zkumavkách, poskytuje tak 4 alikvoty. Každý alikvot byl dále rozdělen na čtvrtinové podíly, ve kterém byla provedena acetylace. Výsledný produkt byl analysován v GC systému čtyřikrát, tedy bylo vyhodnoceno celkem 64 chromatogramů ve 4 x 4 x 4 faktoriálovém designu. Rozptyl stanovení necholesterolových sterolů u klinických vzorků jsme získali z dat kontrolní skupiny (kapitola 2.5).

Výsledky

Stanovení koncentrace necholesterolových sterolů v plasmě/seru zahrnuje několik kroků, které mohou ovlivnit konečný výsledek. Příspěvek jednotlivých kroků k celkové chybě metody byl určen podle schématu:

1. saponifikace, 2. acetylace, 3. GC stanovení

Příspěvky jednotlivých kroků analýzy jsou shrnuty v tabulce 3.1.2.3. V porovnání s příspěvkem kroku plynové chromatografie k celkové chybě analýzy mastných kyselin (kapitola 3.1.1.2) u analýzy necholesterolových sterolů je příspěvek chromatografie nezanedbatelný a dosahuje více než 5 %. Nejvyšší celková chyba metody dosáhla 26,1 % pro lanosterol, u kterého je tak kvantitativní hodnocení vyloučeno. Saponifikační a acetylační krok analýzy většinou nezatížily výsledek analýzy takovou chybou jako plynová chromatografie.

Tabulka 3.1.2.3 Příspěvek jednotlivých kroků k celkové chybě metody

Sterol	c ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) ^a	Saponifikace ^b	Acetylace ^c	GC analýza ^d	Celková chyba metody
5 α -cholestanol	4,56 \pm 0,87	4,4	15,7	12,4	19,1
lathosterol	6,65 \pm 0,42	1,9	2,7	5,8	6,3
kampesterol	8,59 \pm 0,48	2,3	2,4	5,1	5,6
desmosterol	2,55 \pm 0,25	4,5	6,2	6,8	9,8
lanosterol	2,99 \pm 0,78	20,0	20,5	9,8	26,1
β -sitosterol	6,66 \pm 0,45	2,4	3,7	5,7	6,7

^a – aritmetický průměr \pm SD ($n = 64$), ^b – RSD kroku zmýdlení, ^c – RSD acetylačního kroku, ^d – RSD plynové chromatografie

Diskuse

Příspěvek saponifikačního a acetylačního kroku analýzy se u většiny sterolů pohyboval pod hodnotou 6 %, výjimkou bylo stanovení lanosterolu, kde oba kroky dosahovaly vysokých chyb. Lanosterol obsahuje v těsné blízkosti hydroxylové skupiny ještě dvě methylové skupiny

a je možný jejich sterický efekt při acetylaci. Acetylační krok jinak dosahoval nízkého příspěvku k chybě metody, nižšího, než krok analýsy pomocí GC.

Vysoký příspěvek plynové chromatografie k celkové chybě metody lze vysvětlit tím, že při průchodu vzorku analytickým systémem zřejmě dochází k dějům, které snižují reprodukovatelnost záznamu³⁹³, např. k isomerizačním dějům během dlouhé doby analýsy, navíc v případě 5 α -cholestanolu je přesná integrace nemožná, protože u klinického vzorku interferuje se stanovením 5 α -cholestanolu velký peak cholesterolu, kterého je řádově tisícinásobek ve srovnání s ostatními stanovovanými složkami (viz [obrázek 3.1.2.2](#)). V souhlase s horším dělením kritického páru při nadbytku jedné složky jsou 5 α -cholestanol a cholesterol nedokonalě rozděleny, takže peak 5 α -cholestanolu je deformován a není vhodný pro integraci. U kolony CP Wax 52 CB, jež je o málo méně polární než DB-FFAP, je eluční pořadí stejné a peak 5 α -cholestanolu je zde též deformován³⁹⁹. Nepochybně kolona (např. OV-1) vůbec tento kritický pár nerozdělí, peak 5 α -cholestanolu je zjevný pouze při vysoké koncentraci, například u pacientů s cerebrotendinosní xanthomatosou³⁹⁹.

Pro minoritní složku (lanosterol) byly pozorovány v souhlase s literaturou³⁵² vysoké hodnoty celkové chyby stanovení. Hodnoty celkové chyby metody se pro lanosterol, kampesterol a β -sitosterol v literatuře pohybují okolo 2-3 % (RSD)^{88,352,400} až 8 %^{90,352} podle typu použitého vzorku, přičemž směsi standardů mívají tuto chybu samozřejmě nižší.

Pokud porovnáme celkovou chybu stanovení s daty klinického souboru o stejné velikosti ([tabulka 3.1.2.4](#)), zjistíme, že při porovnávání skupin by se celková chyba metody projevila při porovnávání souborů s rozdílem daleko větším, než je rozmezí dat klinického souboru. Pro párová porovnávání je ovšem nutné vycházet z opakovaných měření, protože klinicky významné změny mohou dosahovat i nižších hodnot, než je rozptyl dat klinického souboru.

Tabulka 3.1.2.4 Porovnání chyby metody a rozptylu dat v klinickém souboru

Sterol	c ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) ^a	celková chyba metody	data klinického souboru ^b	data klinického souboru ^c	RSD (klin)/RSD (metoda)
5 α -cholestanol	4,56 \pm 0,87	19,1	N.D.	N.D.	N.D.
lanosterol	6,65 \pm 0,42	6,3	2,45	12,03	8,11
kampesterol	8,59 \pm 0,48	5,6	7,63	20,21	6,18
desmosterol	2,55 \pm 0,25	9,8	1,29	4,57	4,13
lanosterol	2,99 \pm 0,78	26,1	0,88	4,56	1,81
β -sitosterol	6,66 \pm 0,45	6,7	5,00	13,92	4,71

^a – průměr \pm SD ($n = 64$), ^b – 5. percentil, ^c – 95. percentil, $n = 64$, N.D. - nestanoveno

Distribuce hodnot necholesterolových sterolů v našem klinickém souboru ($n = 64$) je

podobná distribuci pro větší vzorek populace ($n = 160$)⁸⁷, což znamená, že hodnoty necholesterolových sterolů u evropské populace mají pro náhodné výběry analogické rozdělení a analogické SD (RSD).

Obecně se do celkové chyby stanovení promítá zastoupení sterolu, minoritní steroly jsou někdy eluovány blízko nečistot pocházejících ze vzorku, případně z použitých činidel a výsledné obtíže při integraci se v hodnotě chyby odrazí.

Závěr

Byly stanoveny příspěvky jednotlivých kroků analýsy pro některé necholesterolové steroly vyskytující se v lidské plasmě. Kvantitativní hodnocení lanosterolu a 5 α -cholestanolu je zatíženo chybou vylučující použití této analytické metody pro hodnocení klinických vzorků.

3.2 EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE

3.2.1 Vliv hypolipidemických léků na složení lipidů v mozkové tkáni potkana – Studie V

(Studie byla publikována v článku *Vecka M, Tvrzická S, Staňková B, Novák F, Nováková O, Žák A: Hypolipidemic drugs can change the composition of rat brain lipids. Tohoku J Exp Med 2004; 204(4): 299-308.*)

Škodlivé účinky statinů (reversibilních kompetitivních inhibitorů HMG-CoA reductasy) jsou popisovány jako poruchy spánku⁴⁰¹, bolesti hlavy⁴⁰², myopatie^{403,404} a zvýšené hladiny kreatinkinasy. Fibráty (endogenní ligandy PPAR α ^{405,406}) mohou způsobit kožní reakce⁴⁰⁷, renální dysfunkci⁴⁰⁸ a v některých případech i poruchy nervových funkcí⁴⁰⁹. Vedlejší účinky fibrátů a statinů na centrální nervovou soustavu jsou velmi důležité, protože tyto látky snižují hladinu lipidů v seru a mohou mít vliv i na složení lipidových membrán v mozku. Proto jsme se v této studii zaměřili na účinek tří široce používaných statinů - pravastatinu (PRA), lovastatinu (LOV) a fluvastatinu (FLU), a jednoho fibrátu, fenofibrátu (FEN), na složení lipidů v mozkové tkáni potkanů.

Materiál a metody

Pro účely této studie jsme použili samců potkanů kmene Wistar, kterým byly podávány zkoumané léky. Kontrolní skupina dostávala místo léku fyziologický roztok (detaily viz [kapitola 2.4](#)). Ze vzorků mozkové tkáně byly izolovány jednotlivé lipidové třídy ([kapitola 2.6.3](#)) a v nich stanoven profil mastných kyselin ([kapitola 2.6.4.1](#)).

Výsledky

V průběhu studie byla zaznamenávána tělesná hmotnost potkanů. Konečný hmotnostní přírůstek (40 ± 12 % původní váhy) se mezi skupinami nelišil. Žádné změny jsme také nezaznamenali pro mozkovou tkáň ($0,40 \pm 0,05$ % tělesné hmotnosti).

[Tabulka 3.2.1.1](#) podává přehled o některých biochemických parametrech vzorků plasmy. U skupiny FEN jsme pozorovali zvýšenou hladinu plasmatické glukosy, celkové bílkoviny, kreatininu a fruktosylaminu. Plasmatický kreatinin byl též zvýšen u všech skupin, kterým byly podávány statiny. U skupiny FLU se prokázalo zvýšení hladiny fruktosylaminu a celkové bílkoviny. Podávání pravastatinu mělo za následek zvýšení koncentrace močoviny. Další biochemické parametry, jako koncentrace bilirubinu, aktivity aspartát a alanin aminotransferas, koncentrace celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, triacylglycerolů a fosfolipidů se od kontrolní skupiny nelišily (data neuvedena).

Složení lipidů mozkové tkáně bylo podáváním hypolipidemických léků ovlivněno.

Zastoupení cholesterolu bylo sníženo u skupin LOV [$16,8 \pm 1,4$ vs. $18,6 \pm 1,3$ mg/g w.w. (wet weight, hmotnost vlhké tkáně), $P < 0,05$) a PRA ($16,2 \pm 1,4$ vs. $18,6 \pm 1,3$ mg/g w.w., $P < 0,05$), zastoupení difosfatidylglycerolů (DPG) ve skupinách LOV ($1,3 \pm 0,5$ vs. $2,5 \pm 0,5$ mg/g w.w., $P < 0,01$) a FLU ($1,8 \pm 0,4$ vs. $2,5 \pm 0,5$ mg/g w.w., $P < 0,05$) bylo také sníženo. Zvýšené zastoupení jsme pozorovali pro ceramid monohexosidy (CMH) u skupin LOV ($23,2 \pm 2,4$ vs. $11,7 \pm 1,9$ mg/g w.w., $P < 0,001$) a PRA ($17,7 \pm 3,1$ vs. $11,7 \pm 1,9$ mg/g w.w., $P < 0,01$), SM u skupin LOV ($4,6 \pm 0,7$ vs. $3,9 \pm 0,4$ mg/g w.w., $P < 0,01$) a FLU ($5,2 \pm 0,9$ vs. $3,9 \pm 0,4$ mg/g w.w., $P < 0,001$). U skupiny, které byl podáván fenofibrát, jsme žádné změny v zastoupení lipidových tříd nepozorovali.

Tabulka 3.2.1.1 Účinek hypolipidemických léků na některé složky plasmy

Parametr	Skupina				
	Kontrola (n = 8)	Fenofibrát (n = 8)	Fluvastatin (n = 8)	Lovastatin (n = 8)	Pravastatin (n = 8)
Glukosa (mmol.l ⁻¹)	9,1 ± 1,0	11,8 ± 2,2**	9,2 ± 1,1	10,3 ± 1,9	8,8 ± 1,0
CB (g.l ⁻¹)	57,2 ± 3,0	63,6 ± 2,0***	63,1 ± 3,4**	59,7 ± 4,5	58,9 ± 3,6
močovina (mmol.l ⁻¹)	6,4 ± 0,3	6,7 ± 0,6	6,8 ± 0,4	6,7 ± 1,2	7,5 ± 0,7**
kreatinin (μmol.l ⁻¹)	35,3 ± 4,3	43,1 ± 8,7*	45,1 ± 4,2***	44,9 ± 4,6***	47,1 ± 8,2**
FRU (μmol.l ⁻¹)	129 ± 7	139 ± 8*	143 ± 13*	136 ± 7	134 ± 7

Data jsou ve formátu průměr ± SD. Symboly pro statistickou signifikanci: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ (ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem). Zkratky: FRU - fruktosylamin, CB – celková bílkovina

Profil mastných kyselin v CMH, fosfatidylethanolaminech (PE), a PC je ukázán v tabulkách 3.2.1.2 až 3.2.1.4. Nejdůležitější změny byly pozorovány v CMH u skupiny FEN. Zastoupení SFA – SA a behenové (22:0) bylo sníženo, naproti tomu zastoupení PUFA – AA, dokosatetraenové (22:4n-6), EPA, a dokosapentaenové (22:5n-3, DPA-3) bylo zvýšeno. Pouze minoritní změny byly zaznamenány u skupiny LOV – zvýšený obsah EPA a DPA-3. Fenofibrát snížil zastoupení dvou minoritních MFA – 7-hexadecenové (16:1n-9) a erukové (22:1n-9). Ve skupině PRA jsme nepozorovali žádné podstatné změny v zastoupení mastných kyselin.

Profil mastných kyselin v PE byl nejvíce změněn ve skupině FEN. Snížené zastoupení SA přispěl nejvíce ke snížení obsahu SFA, což bylo kompensováno zvýšeným zastoupením DHA. Jediná signifikantní změna ve skupině FLU byl mírný pokles zastoupení eikosatrienové kyseliny (20:3n-6). Další hypolipidemické léky (LOV a PRA) neměly na profil mastných kyselin v PE žádný vliv. S výjimkou malého snížení obsahu POA u skupiny LOV nebyly zaznamenány žádné změny v profilu mastných kyselin v mozkových PC.

Diskuse

Zvýšená hladiny glukosy u skupiny FEN spolu se zvýšenou koncentrací fruktosylaminu

naznačují jeden z možných vlivů fenofibrátu na metabolismus sacharidů. Fibráty podporují expresi fosfoenolpyruvát karboxykinasy, jež je součástí glukoneogenese⁴¹⁰. Zvýšená produkce hexosafosfátů touto cestou by mohla následně vést k podpoře glukoneogenese.

Tabulka 3.2.1.2 Profil mastných kyselin v ceramid monohexosidech

Mastná kyselina	Skupina				
	Kontrola (n = 8)	Fenofibrát (n = 8)	Fluvastatin (n = 8)	Lovastatin (n = 8)	Pravastatin (n = 8)
16:0	10,18 ± 4,69	9,61 ± 5,55	7,60 ± 1,93	8,60 ± 3,26	8,76 ± 1,86
16:1n-9	0,42 ± 0,28	0,19 ± 0,09*	0,31 ± 0,17	0,34 ± 0,31	0,41 ± 0,28
18:0	18,94 ± 2,21	17,86 ± 1,87	16,16 ± 1,73*	16,81 ± 1,88	17,89 ± 2,88
18:1n-9	22,12 ± 4,05	20,53 ± 2,67	18,81 ± 4,48	20,13 ± 4,00	21,36 ± 2,88
18:1n-7	4,42 ± 0,75	4,23 ± 0,62	3,96 ± 0,76	4,18 ± 0,83	4,02 ± 0,70
18:2n-6	1,21 ± 0,38	1,05 ± 0,27	1,13 ± 0,42	1,02 ± 0,31	1,57 ± 0,69
20:1n-9	3,86 ± 1,04	4,27 ± 0,91	4,06 ± 0,51	4,18 ± 0,79	4,08 ± 0,50
20:1n-7	1,62 ± 0,51	1,69 ± 0,50	1,54 ± 0,40	1,64 ± 0,58	2,07 ± 1,00
20:4n-6	10,71 ± 2,61	11,84 ± 1,75	13,89 ± 1,72*	12,73 ± 1,73	12,14 ± 1,37
20:5n-3	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,05	0,06 ± 0,03**	0,04 ± 0,02*	0,09 ± 0,09
22:0	0,82 ± 0,29	0,53 ± 0,21	0,44 ± 0,21*	0,57 ± 0,24	0,51 ± 0,41
22:1n-9	0,73 ± 0,15	0,47 ± 0,18*	0,51 ± 0,13*	0,59 ± 0,18	0,51 ± 0,22
22:4n-6	4,94 ± 1,43	5,95 ± 1,39	6,79 ± 1,53*	6,13 ± 1,22	5,62 ± 1,16
22:5n-3	0,99 ± 0,31	1,09 ± 0,17	1,44 ± 0,34*	1,41 ± 0,31*	1,01 ± 0,25
22:6n-3	15,11 ± 6,83	17,25 ± 3,84	19,32 ± 4,75	17,80 ± 5,26	15,38 ± 4,58
Σ SFA	31,02 ± 5,27	28,88 ± 5,69	25,17 ± 3,32*	27,07 ± 3,73	28,22 ± 3,08
Σ MFA	34,18 ± 6,17	32,12 ± 3,19	30,09 ± 5,55	31,92 ± 5,14	33,41 ± 4,72
Σ PUFA n-6	18,58 ± 3,25	20,48 ± 3,71	23,78 ± 3,65*	21,66 ± 2,85	21,79 ± 2,65
Σ PUFA n-3	16,22 ± 7,13	18,52 ± 4,04	20,97 ± 5,10	19,35 ± 5,53	16,58 ± 4,71

*Symbole a zkratky: Σ - sum. Data jsou uvedena v molárních procentech (průměr ± SD) . Symbole pro statistickou signifikanci: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ (ANOVA s Scheffého post hoc analysou)*

U všech skupin, kterým jsme podávali hypolipidemické léky, jsme pozorovali zvýšenou koncentraci plasmatického kreatininu, což by mohlo ukazovat na poškození svalové tkáně. Několik případů myopatie bylo popsáno u pacientů užívajících fibráty a statiny⁴⁰³, kombinace těchto dvou typů léků je nebezpečnější. Fibráty navíc snižují kreatininovou clearanci⁴¹¹.

V naší studii jsme nepozorovali u žádného ze sledovaných léků změny v koncentracích plasmatických lipidů. Fujioka⁴¹² také nepopsal změny u normolipidemických potkanů po podávání statinů, které by se týkaly hladin celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu. Na druhé straně byl popsán hypocholesterolemický⁴¹³ a hypotriacylglycerolemický⁴¹⁴ účinek fibrátů u potkanů. Vysvětlení této diskrepance zřejmě tkví v rozdílném dávkování fibrátů (10-500 mg/kg), které bylo používáno v jiných studiích^{412,415}, na rozdíl od naší studie, ve které bylo podáváno množství fibrátu odpovídající denní dávce pro člověka (0,3 mg/kg).

Skupina FEN vykazovala tendenci k zisku tělesné hmotnosti a byla u ní zjištěna

hepatomegalie (data neuvedena). Tyto účinky fenofibrátu byly už dříve popsány jako vedlejší efekt fibrátů - agonistů PPAR α , které indukují u hlodavců proliferaci peroxisomů vedoucí k hepatomegalii a následnému zvýšení tělesné hmotnosti⁴¹⁶.

Tabulka 3.2.1.3 Profil mastných kyselin ve fosfatidylethanolaminech

Mastná kyselina	Skupina				
	Kontrola (n = 8)	Fenofibrát (n = 8)	Fluvastatin (n = 8)	Lovastatin (n = 8)	Pravastatin (n = 8)
16:0	6,06 ± 1,11	5,77 ± 0,47	6,34 ± 0,92	6,68 ± 0,96	6,85 ± 1,29
18:0	20,04 ± 1,63	18,39 ± 0,87*	20,56 ± 3,12	20,42 ± 2,84	22,26 ± 5,41
18:1n-9	20,00 ± 1,40	19,49 ± 1,07	20,43 ± 2,34	21,10 ± 2,38	22,10 ± 4,13
18:1n-7	3,70 ± 0,31	3,51 ± 0,25	3,87 ± 0,56	3,84 ± 0,46	4,15 ± 0,91
20:1n-9	5,09 ± 0,56	5,10 ± 0,64	5,26 ± 0,60	5,39 ± 0,70	5,64 ± 1,21
20:1n-7	1,34 ± 0,16	1,34 ± 0,16	1,44 ± 0,20	1,43 ± 0,18	1,48 ± 0,33
20:3n-6	0,61 ± 0,05	0,62 ± 0,05	0,56 ± 0,04*	0,58 ± 0,05	0,56 ± 0,08
20:4n-6	13,58 ± 1,21	14,11 ± 0,49	13,29 ± 1,91	13,08 ± 1,40	12,11 ± 3,65
22:4n-6	6,86 ± 0,51	7,26 ± 0,35	6,79 ± 0,91	6,56 ± 0,94	6,07 ± 1,72
22:5n-3	1,29 ± 0,28	1,23 ± 0,20	1,31 ± 0,27	1,40 ± 0,33	0,99 ± 0,41
22:6n-3	19,04 ± 2,40	21,06 ± 2,08*	17,93 ± 4,47	17,29 ± 4,61	15,45 ± 3,70
Σ SFA	26,75 ± 2,00	24,74 ± 0,89*	27,52 ± 3,99	27,74 ± 3,72	29,74 ± 6,84
Σ MFA	31,04 ± 2,40	30,29 ± 2,05	31,93 ± 3,74	32,66 ± 3,69	34,31 ± 6,58
Σ PUFA n-6	21,78 ± 1,56	22,60 ± 0,70	21,22 ± 2,87	20,83 ± 2,39	19,41 ± 1,81
Σ PUFA n-3	20,43 ± 2,52	22,37 ± 2,22	19,33 ± 4,70	18,76 ± 4,86	16,54 ± 3,82

Vysvětlivky a zkratky viz [Tabulka 3.2.1.2](#)

V této studii jsme prokázali, že podávání statinů ovlivňuje složení lipidových tříd v mozkové tkáni. Lovastatin se zdá z použitých statinů jako nejúčinnější co se týče snížení koncentrace cholesterolu. Pokles v koncentraci cholesterolu byl doprovázen zvýšeným zastoupením SM. Obě dvě lipidové třídy jsou důležitými regulátory membránové fluidity, která je úzce spjata s optimální funkcí membrány, což vede k úvaze, že nízká koncentrace cholesterolu je vyvážena zvýšenou koncentrací SM. Lovastatin navíc zvýšil zastoupení CMH. Ceramidy fungují jako druzí poslové v přenosu signálu⁴¹⁷ a jejich homology jsou důležité molekuly pro stresovou odpověď⁴¹⁸. Změněný obsah cerebrosidů po podávání statinů by tak mohl způsobit změny v buněčných odpovědích na vnější signály.

Podávání lovastatinu způsobilo snížení koncentrace DPG v mozkové tkáni. Difosfatidylglycerol je obsažen výlučně v membránách, ve kterých je lokalizována oxidativní fosforylace (tj. vnitřní mitochondriální membrána), a kde DPG funguje jako proton-vyčítavající molekula⁴¹⁹. Zastoupení DPG v těchto membránách přímo ovlivňuje aktivitu enzymů elektronového transportního systému. Satoh a Ichihara⁴²⁰ popsali poškození mitochondriální respirace v myokardu v průběhu ischemie u potkanů, kterým byly podávány

statiny. Bargossi a kol.⁴²¹ pozorovali snížení hladiny ubiquinonu, další části mitochondriálního respiračního řetězce, v krvi účinkem simvastatinu. Difosfatidylglycerol je také kofaktorem translokace cholesterolu z vnější do vnitřní mitochondriální membrány a tak podporuje reakci štěpící boční řetězec cholesterolu⁴²². Nízká koncentrace DPG může tak přispívat k pozorované depleci cholesterolu.

Pravastatin a FLU jsou hydrofilní statiny⁴²³. Jejich podávání neovlivnilo zastoupení lipidových tříd v mozkové tkáni takovou měrou jako podávání lipofilního LOV. Skupina PRA měla snížené zastoupení cholesterolu kompenzované zvýšenou koncentrací CMH, kdežto podávání FLU vedlo ke snížené koncentraci DPG a zvýšené koncentraci SM. Ačkoli hydrofilní statiny mají zanedbatelnou permeabilitu do mozkové tkáně⁴²⁴, pacienti užívající PRA mají nižší prevalenci Alzheimerovy choroby⁴²⁵. První práce o vlivu statinů na metabolismus cholesterolu v mozkové tkáni byla publikována v roce 2002, a v této práci Locatelli a kol.⁴²⁶ dokázali, že u pacientů s hypercholesterolemií vede podávání simvastatinu ke snížení plasmatické hladiny 24(S)-hydroxycholesterolu, což je látka produkovaná hlavně v mozku. Zajímavé je, že pro hydrofilní PRA bylo též popsáno snížení plasmatických hladin 24(S)-hydroxycholesterolu u pacientů s Alzheimerovou chorobou⁴²⁷. Některé studie dokazovaly nižší prevalenci diagnostikované Alzheimerovy choroby a vaskulární demence u hypercholesterolemických pacientů na statinové léčbě^{425,428}. Fakt, že pouze statiny mezi všemi hypolipidemickými léky mají tento preventivní účinek, naznačuje nějakou specifickou farmakologickou vlastnost statinů.

Účinky statinů na centrální nervovou soustavu mohou být odstartovány na úrovni cévní stěny hematoencefalické bariéry (blood brain barrier, BBB) upregulací endotheliální produkce oxidu dusnatého (NO)⁴²⁹. Produkce NO je spojena s metabolismem apoE⁴³⁰, který má zřejmě mnoho funkcí v centrální nervové soustavě⁴³¹. Efekt hydrofilního pravastatinu na mozkovou tkáň může být vysvětlen na základě výše zmíněného mechanismu, který má počátek mimo BBB⁴²⁹. V mozku dospělého potkana je specifická aktivita HMG-CoA reduktasy, klíčového enzymu biosynthetické dráhy cholesterolu, regulována nezávisle na hladině cholesterolu v plasmě⁴³² a uvnitř buněk, homeostasa cholesterolu je spíše řízena pomocí proteinů vázajících se na sterolové regulační elementy, detaily ale stále chybí⁴³³. Biosynthesa cholesterolu odpovídá především na fyziologické požadavky mozkové tkáně, které jsou v dospělosti o řád nižší než po narození⁴³², proto může být cholesterol přenášen do neuronů z astrocytů⁴³⁴.

Profil mastných kyselin byl stanoven v hlavních lipidových třídách: CMH, PE a PC. Nejvíce byl profil mastných kyselin změněn v CMH, ve kterých podávání FLU způsobilo snížení zastoupení SA (hlavní SFA), a zvýšené zastoupení AA a kyseliny 22:4n-6, které jsou

majoritními n-6 PUFA v CMH potkaního mozku. Jiné hypolipidemické léky zastoupení mastných kyselin v CMH podstatně neovlivnily. Mechanismy, které byly navrženy, aby objasnily změny v zastoupení jednotlivých lipidových tříd, se mohou dále odrazit v profilu mastných kyselin v těchto třídách. V CMH skutečně došlo k největším změnám, co se týká změn v koncentraci lipidové třídy a profilu mastných kyselin. Rozdílné účinky jednotlivých statinů by mohly být způsobeny odlišnostmi v chemické struktuře. Část molekuly statinů je založena na skeletu hexahydronaftalenu u PRA a LOV, zatímco struktura FLU je založena na indolu substituovaném fluorofenylovou skupinou²⁸².

Tabulka 3.2.1.4 Profil mastných kyselin ve fosfatidylcholinech

Mastná kyselina	Skupina				
	Kontrola (n = 8)	Fenofibrát (n = 8)	Fluvastatin (n = 8)	Lovastatin (n = 8)	Pravastatin (n = 8)
16:0	33,72 ± 2,97	33,08 ± 2,68	34,82 ± 2,41	32,79 ± 3,08	33,92 ± 2,18
16:1n-7	0,47 ± 0,07	0,40 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,39 ± 0,04*	0,43 ± 0,03
18:0	17,38 ± 1,58	18,42 ± 1,62	16,71 ± 1,40	18,00 ± 1,50	16,90 ± 1,87
18:1n-9	22,62 ± 1,35	22,94 ± 1,22	22,92 ± 0,64	22,74 ± 0,77	22,80 ± 0,99
18:1n-7	6,10 ± 0,35	6,06 ± 0,38	6,33 ± 0,15	5,93 ± 0,21	5,94 ± 0,32
20:1n-9	1,78 ± 0,17	1,82 ± 0,15	1,89 ± 0,38	1,85 ± 0,19	1,72 ± 0,18
20:4n-6	6,56 ± 1,35	6,33 ± 0,85	6,17 ± 0,78	6,54 ± 0,88	6,94 ± 0,83
22:4n-6	1,11 ± 0,13	1,12 ± 0,22	1,11 ± 0,11	1,16 ± 0,19	1,13 ± 0,18
22:6n-3	6,08 ± 0,60	6,15 ± 1,63	5,81 ± 0,83	6,70 ± 1,24	6,45 ± 1,12
Σ SFA	52,05 ± 1,50	52,46 ± 1,25	52,44 ± 1,55	51,74 ± 1,66	51,72 ± 0,73
Σ MFA	32,40 ± 1,68	32,59 ± 1,68	33,02 ± 1,08	32,26 ± 0,98	32,27 ± 1,24
Σ PUFA n-6	8,96 ± 2,14	8,36 ± 0,96	8,21 ± 0,87	8,60 ± 1,03	9,10 ± 0,86
Σ PUFA n-3	6,59 ± 0,73	6,60 ± 1,75	6,33 ± 0,86	7,30 ± 1,33	6,91 ± 1,18

Vysvětlivky a zkratky viz [Tabulka 3.2.1.2](#)

Mastné kyseliny ve fosfatidylethanolaminech byly nejvíce ovlivněny podáváním FEN. V tomto fosfolipidu bylo sníženo zastoupení SA a zvýšený obsah DHA. Přísun DHA do mozku je zajištěn mechanismy přednostně zásobujícími tkáň DHA a AA⁴³⁵. Zřejmě je to způsobeno důležitostí AA pro tvorbu eikosanoidů a DHA pro přenos signálu⁴³⁶.

Závěr

Rozdílnost změn po podávání statinů a fenofibrátu v této studii nedovoluje činit obecné závěry o příznivých nebo škodlivých účincích těchto léků. Co se týče změn v koncentraci cholesterolu, membránová fluidita může být vyvažována změnami v zastoupení cholesterolu a CMH nebo SM. Cholesterol a sfingolipidy mají důležité funkce v metabolismu mozkové tkáně; změny v jejich koncentracích způsobené podáváním statinů by mohly hrát roli v patogenezi neurologických a mentálních symptomů. Účinky statinů a fibrátů na lipidový metabolismus mozkové tkáně by měly být předmětem dalšího výzkumu.

3.3 KLINICKÉ STUDIE

3.3.1 Mastné kyseliny a necholesterolové steroly u mentální anorexie – Studie VI

(Studie byla publikována v článku *Žák A, Vecka M, Tvrzická E, Hrubý M, Novák F, Papežová H, Lubanda H, Veselá L, Staňková B: Composition of plasma fatty acids and non-cholesterol sterols in anorexia nervosa. Physiol Res 2005; 54(4): 443-451.*)

Mentální anorexie je definována jako psychiatrické onemocnění nejasné etiologie charakterisované sníženým příjmem potravy, patologickou honbou za štíhlostí, a výraznou ztrátou tělesné hmotnosti. Tato porucha představuje současně patofysiologický model jednoduchého hladovění, který je doprovázen mnohými endokrinními a metabolickými odchylkami. Více než polovina pacientů s AN je hypercholesterolemická, přičemž někdy je tato hyperlipoproteinemie popisována jako typ IIa^{377,437,438}. Patofysiologické mechanismy, které způsobují hypercholesterolemii u AN, nejsou ještě zcela prozkoumány⁴³⁹. Cílem této studie bylo sledovat zastoupení mastných kyselin v plasmatických esterech cholesterolu, PL a TAG u žen s AN, vztah mastných kyselin k plasmatickým lipidům, apoproteinům a necholesterolovým sterolům.

Materiál a metody

Studovaná skupina sestávala z 16 žen s AN a 25 kontrol, které měly stejné pohlaví a věk. Protokol studie je podrobně popsán v kapitole 2.5. Jedenáct žen mělo restriktivní formu AN, čtyři kombinovanou a jedna měla purgativní typ AN. Biochemické analýsy byly provedeny podle postupu uvedeného v kapitolách 2.6.1 a 2.6.2, analýsy mastných kyselin podle kapitoly 2.6.4.1 a necholesterolových sterolů podle kapitoly 2.6.4.2.

Výsledky

Data naměřená u žen s AN vykazují typické známky podvýživy – signifikantně nižší tělesná hmotnost, BMI, procento tělesného tuku, hmotnost tělesného tuku a obvod paže (vše $P < 0,001$; Tabulka 3.3.1.1). Nezaznamenali jsme rozdíl mezi kontrolní skupinou a AN, co se týká koncentrací celkové bílkoviny, prealbuminu a albuminu. Pouze aktivita cholinesterasy ve skupině AN byla významně nižší, ale zůstala ve fyziologickém rozmezí. Mentální anorektičky měly lehce zvýšené parametry jaterních testů (ALT, AST, GMT) (Tabulka 3.3.1.2).

Ve skupině AN byly zvýšené hladiny plasmatického TC, TAG, PL a HDL-C. Koncentrace LDL-C, apo B, apo A-I a Lp[a] se významně nelišily od kontrolní skupiny.

Dále jsme pozorovali u AN zvýšené koncentrace NEFA, kampesterolu a β -sitosterolu. Koncentrace lathosterolu a poměru lathosterol/TC se u obou skupin významně nelišily, stejně

jako poměry kampesterol/TC a β -sitosterol/TC (Tabulka 3.3.1.3). Významná korelace mezi lathosterolem a TC byla nalezena pouze u kontrolní skupiny ($r = 0,537$; $P < 0,01$, Spearmanův korelační koeficient pořadí), u skupiny AN nebyla tato korelace významná ($r = 0,300$; NS).

Tabulka 3.3.1.1 Demografická data skupiny mentální anorexie a kontrolní skupiny

Parametr	Kontrolní skupina (n = 25)	Mentální anorexie (n = 16)
věk (roky)	22,5 ± 0,6 ^a	22,4 ± 1,1
trvání mentální anorexie (roky)	NA	3,1 ± 0,6
tělesná hmotnost (kg)	58,0 ± 1,7	42,7 ± 2,7 *** ^c
ideální tělesná hmotnost (procenta)	96,5 ± 2,0	68,8 ± 2,9 **
úbytek tělesné hmotnosti (kg)	NA	2,3 - 17,0 ^d
změna v tělesné hmotnosti (procenta)	NA	5,5 ± 0,6 ^e
body mass index (kg/m ²)	20,9 ± 0,4	15,4 ± 0,7 ***
procento tuku (antropometricky)	25,2 ± 1,0	15,1 ± 1,5 ***
hmotnost tuku (kg)	14,8 ± 0,9	5,3 ± 1,0 ***
tukuprostá hmota (kg)	43,1 ± 1,2	37,4 ± 1,9 **
součet čtyř kožních řas ^b (mm)	48,3 ± 2,8	16,2 ± 2,3 ***
obvod pasu (cm)	69,4 ± 1,1	57,7 ± 1,4 **
poměr obvodů pasu a boků (1)	0,77 ± 0,02	0,73 ± 0,01 *
obvod paže (cm)	20,21 ± 0,3	17,5 ± 0,6 ***

^{a/} průměr ± SEM; ^{b/} biceps, triceps, subscapularis, suprailiac ^{c/} Mannův-Whitneyho U-test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, ^{d/} rozmezí, ^{e/} za poslední tři měsíce, NA – nestanoveno

Tabulka 3.3.1.2 Biochemické parametry zkoumaných skupin

Parametr	Kontrolní skupina (n = 25)	Mentální anorexie (n = 16)
glukosa (mmol/l)	4,67 ± 0,06 ^a	4,60 ± 0,14
bilirubin (μmol/l)	11,4 ± 0,8	10,2 ± 1,0
ALT (μkat/l)	0,34 ± 0,03	0,76 ± 0,29 * ^b
AST (μkat/l)	0,45 ± 0,06	0,71 ± 0,20 **
GMT (μkat/l)	0,23 ± 0,01	0,37 ± 0,07 **
ALP (μkat/l)	1,12 ± 0,03	1,24 ± 0,15
celková bílkovina (g/l)	79,3 ± 0,7	77,4 ± 2,6
albumin (g/l)	46,2 ± 0,4	45,2 ± 1,3
prealbumin (g/l)	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,09
cholinesterasa (μkat/l)	157,3 ± 3,8	140,3 ± 8,9 *
močovina (mmol/l)	4,1 ± 0,2	4,4 ± 0,4
kreatinin (μmol/l)	83,4 ± 1,6	82,4 ± 2,8
kyselina močová (μmol/l)	251,9 ± 8,1	235,8 ± 22,1

^{a/} průměr ± SEM, ^{b/} Mannův-Whitneyho U-test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Zastoupení mastných kyselin v lipidových třídách plasmy je uvedeno v Tabulce 3.3.1.4. Mezi kontrolní skupinou a AN jsme pozorovali rozdíl v celkovém profilu mastných kyselin

pro CE a PC (obě $P < 0,05$; Hottellingův t-test), u TAG rozdíly v distribuci mastných kyselin nedosáhly významných změn. Nejvíce konsistentní změnou u skupiny AN, testovanou jednorozměrnou neparametrickou analýsou (Mannův-Whitneyho U-test), bylo snížené zastoupení LA a zvýšené zastoupení POA ve všech lipidových třídách. V CE jsme navíc pozorovali zvýšené zastoupení OA, kyseliny vakcenové (18:1n-7) a snížený obsah DHA.

Tabulka 3.3.1.3 Koncentrace plasmatických lipidů, necholesterolových sterolů, lipoproteinů a apolipoproteinů

Parametr	Kontrolní skupina (n = 25)	Mentální anorexie (n = 16)
celkový cholesterol (mmol/l)	4,51 ± 0,11 ^a	5,52 ± 0,41 ^{** b}
triacylglyceroly (mmol/l)	0,85 ± 0,09	1,21 ± 0,08 ^{***}
fosfolipidy (mmol/l)	2,65 ± 0,07	3,15 ± 0,15 ^{**}
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,22 ± 0,05	1,58 ± 0,05 ^{***}
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,91 ± 0,11	3,49 ± 0,50
non-HDL-cholesterol (mmol/l)	3,30 ± 0,11	4,04 ± 0,49
apolipoprotein B (g/l)	0,69 ± 0,04	0,76 ± 0,05
apolipoprotein A-I (g/l)	1,58 ± 0,04	1,78 ± 0,05
lipoprotein (a) (g/l)	0,16 ± 0,05	0,22 ± 0,08
neesterifikované mastné kyseliny (mmol/l)	0,44 ± 0,05	0,78 ± 0,09 ^{***}
lathosterol (μmol/l)	4,84 ± 0,53	3,70 ± 0,69
kampesterol (μmol/l)	14,50 ± 0,89	17,77 ± 2,69 [*]
β-sitosterol (μmol/l)	11,28 ± 0,46	17,46 ± 2,66 ^{**}
lathosterol/celkový cholesterol (μmol/mmol)	1,05 ± 0,09	0,81 ± 0,16
kampesterol/ celkový cholesterol (μmol/mmol)	3,20 ± 0,21	4,35 ± 0,59
β-sitosterol/ celkový cholesterol (μmol/mmol)	2,51 ± 0,14	3,14 ± 0,41

^{a/} průměr ± SEM, ^{b/} Mannův-Whitneyho U-test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Zvýšený obsah PA a snížený obsah kyseliny 7-hexadecenové (16:1n-9) byl stanoven u TAG a PC. Snížené zastoupení SA byl pozorováno pouze u plasmatických PC. V [tabulce 3.3.1.5](#) jsou uvedeny odvozené parametry metabolismu mastných kyselin – sumy obsahů SFA, MFA a PUFA a také některé poměry mastných kyselin jako produktů/substrátů aktivit D9D, D6D, D5D, stejně jako aktivity elongasy. Skupina AN měla zvýšené zastoupení SFA v TAG a PC, zvýšený obsah MFA v CE a PC a snížené zastoupení n-6 PUFA ve všech lipidových třídách. U třídy n-3 PUFA nebyly zaznamenány žádné změny. Vzestup aktivity D9D byl pozorován v CE a PC. Snížená aktivita D5D byla zachycena v CE u skupiny AN.

Diskuse

Mentální anorexie je porucha příjmu potravy s nejasnou etiologií, kterou můžeme charakterisovat pomocí mnohých komplikací, přičemž nejdůležitější z nich spadají do skupiny endokrinních a metabolických poruch⁴⁴⁰. Endokrinní komplikace asociované s AN zahrnují

hypothalamický hypogonadismus, hyperkortisolemii (i přes normální hladiny adrenokortikotropního hormonu) a abnormality thyroideálních funkcí, které zahrnují snížené hladiny trijodthyroninu i thyroxinu a zvýšené koncentrace reversního trijodthyroninu⁴⁴¹. Je všeobecně známo, že každá z uvedených endokrinních poruch může být spojena se sekundární hyper- nebo dyslipoproteinemii^{377,439}.

Tabulka 3.3.1.4 Zastoupení mastných kyselin v lipidových třídách plasmu

Mastná kyselina ^d	Cholesteryl estery		Triacylglyceroly		Fosfatidylcholinu	
	kontrolní skupina	mentální anorexie * ^c	kontrolní skupina	mentální anorexie	kontrolní skupina	mentální anorexie * ^c
14:0	1,03 ± 0,07 ^a	0,87 ± 0,10	1,62 ± 0,16	2,00 ± 0,20	0,27 ± 0,02	0,29 ± 0,03
16:0	10,71 ± 0,26	11,65 ± 0,42	21,73 ± 0,67	24,75 ± 0,66** ^b	25,90 ± 0,34	28,11 ± 0,52**
16:1n-9	0,79 ± 0,03	0,68 ± 0,05	0,98 ± 0,03	0,81 ± 0,04**	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01
16:1n-7	2,37 ± 0,15	3,37 ± 0,34**	3,53 ± 0,20	4,62 ± 0,41**	0,62 ± 0,03	0,84 ± 0,07**
18:0	2,39 ± 0,08	2,53 ± 0,19	3,29 ± 0,16	3,31 ± 0,14	13,67 ± 0,27	12,59 ± 0,37
18:1n-9	16,93 ± 0,39	20,76 ± 0,98**	39,47 ± 0,55	39,96 ± 1,11	10,72 ± 0,27	12,48 ± 0,48*
18:1n-7	1,40 ± 0,04	1,57 ± 0,06*	3,19 ± 0,13	3,35 ± 0,19	2,18 ± 0,05	2,18 ± 0,07
18:2n-6	53,59 ± 0,82	47,96 ± 1,35***	20,03 ± 0,96	15,16 ± 0,90**	25,61 ± 0,56	23,16 ± 0,86*
18:3n-6	0,76 ± 0,04	0,95 ± 0,16	0,44 ± 0,03	0,39 ± 0,06	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,02
18:3n-3	0,76 ± 0,03	0,78 ± 0,04	1,69 ± 0,09	1,45 ± 0,18	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,02
20:1n-9	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01
20:2n-6	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,48 ± 0,03
20:3n-6	0,61 ± 0,20	0,67 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,02	2,86 ± 0,10	3,15 ± 0,23
20:4n-6	6,93 ± 0,27	6,09 ± 0,31	1,46 ± 0,08	1,33 ± 0,15	10,82 ± 0,30	10,16 ± 0,55
20:5n-3	0,68 ± 0,05	0,64 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,05	0,77 ± 0,06	0,77 ± 0,03
22:4n-6	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,02
22:5n-6	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,34 ± 0,03
22:5n-3	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,37 ± 0,04	1,06 ± 0,05	1,06 ± 0,08
22:6n-3	0,66 ± 0,30	0,52 ± 0,05*	0,56 ± 0,05	0,43 ± 0,05	3,58 ± 0,19	3,12 ± 0,23

^{a/} průměr ± SEM, ^{b/} Manniv-Whitneyho U-test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ ^{c/} Hottelingův mnohonásobný t-test: * $P < 0,05$

Změny v hladinách a zastoupení plasmatických lipidů a LP implikují některé patofysiologické mechanismy dyslipidemie u mentální anorexie. Zvýšená koncentrace TC u AN je pravděpodobně způsobena (mimo zvýšení HDL-C) zvýšenými koncentracemi LP bohatých na TAG (VLDL a IDL). Rozdíly mezi vypočítanými koncentracemi LDL-C se od kontrol signifikantně nelišily. Pro lipidový a LP metabolismus u AN byly v literatuře publikovány nejednoznačné výsledky. Někteří autoři^{437,438} uvádějí, že sekundární hypercholesterolemie je způsobena zvýšenými koncentracemi LDL-C u přibližně poloviny žen s AN. Jiní, např. Crisp a kol.⁴⁴², našli téměř normální hodnoty plasmatického TC, přičemž pouze dvě z dvanácti osob měly hypercholesterolemii. Další autoři⁴⁴³ popsali pouze zvýšení HDL-C u AN. Mentální anorexie může být rozdělena na několik typů nejen podle

mechanismů ztráty tělesné hmotnosti⁴⁴⁰, ale také podle metabolismu LP a zastoupení lipidových tříd⁴⁴⁴.

Tabulka 3.3.1.5 Odvozené parametry metabolismu mastných kyselin

Parametr	Cholesteryl estery		Triacylglyceroly		Fosfatidylcholiny	
	kontrolní skupina	mentální anorexie * ^c	kontrolní skupina	mentální anorexie	kontrolní skupina	mentální anorexie * ^c
Σ SFA	14,23 ± 0,34 ^a	15,14 ± 0,55	26,71 ± 0,84	30,12 ± 0,70 ^{b**}	39,90 ± 0,23	41,05 ± 0,32**
Σ MFA	21,44 ± 0,51	26,45 ± 1,19***	47,50 ± 0,74	49,11 ± 1,19	13,90 ± 0,31	15,86 ± 0,52**
Σ PUFA n-6	62,09 ± 0,79	55,85 ± 1,44***	22,90 ± 1,00	18,29 ± 1,03*	40,46 ± 0,43	37,79 ± 0,58**
Σ PUFA n-3	2,24 ± 0,08	2,07 ± 0,13	2,89 ± 0,14	2,47 ± 0,23	5,74 ± 0,23	5,30 ± 0,25
16:1n-7/16:0 ^d	0,21 ± 0,01	0,29 ± 0,03*	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,0*
18:1n-9/18:0 ^d	7,23 ± 0,27	8,74 ± 0,65*	12,76 ± 0,72	12,31 ± 0,49	0,79 ± 0,03	1,01 ± 0,05***
18:3n-6/18:2n-6 ^e	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	2 E-3 ± 4 E-4	4 E-3 ± 8 E-4
20:3n-6/18:2n-6 ^f	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01
20:4n-6/20:3n-6 ^g	11,61 ± 0,53	9,54 ± 0,77*	4,95 ± 0,26	4,41 ± 0,53	3,92 ± 0,19	3,63 ± 0,43
20:3n-6/18:3n-6 ^h	0,84 ± 0,04	0,92 ± 0,12	0,77 ± 0,07	1,18 ± 0,14*	37,90 ± 2,16	37,97 ± 4,56
20:4n-6/18:2n-6 ⁱ	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,05

^{a/} průměr ± SEM, ^{b/} Mannův-Whitneyho U-test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ ^{c/} Hotellingův mnohonásobný t-test: * $P < 0,05$ (vypočítán pouze pro sumy SFA, MFA, PUFA) ^{d/} D9 desaturasa (D9D), ^{e/} D6D, ^{f/} D6D + elongasa (E), ^{g/} D5D, ^{h/} E, ^{i/} D6D + D5D + E

Ve studii jsme nenašli žádné rozdíly mezi hladinami lathosterolu a jeho poměru vůči TC u AN vs. kontrolní skupiny. Protože tyto parametry odrážejí úroveň syntézy cholesterolu *de novo*^{309,400}, předpokládáme, že zvýšená hladina TC je způsobena sníženým katabolismem TC, zřejmě díky sníženému katabolismu VLDL *via* jejich konverzí na IDL a LDL. Naše výsledky jsou ve shodě s nálezy Nestela⁴⁴⁵, který popsal sníženou sekreci žlučových kyselin u AN, a také s prací Feilleta³⁰⁵, jenž popsal zvýšené koncentrace plasmatického TC spojené s normální úrovní syntézy cholesterolu u AN.

Zvýšené koncentrace rostlinných sterolů (kampesterolu a β-sitosterolu) u AN, jež jsou ukazateli absorpce cholesterolu v dietě⁴⁴⁶, naznačují, že dyslipidemie u naší skupiny AN může být částečně způsobena zvýšenou absorpcí exogenního cholesterolu. Tento předpoklad je podpořen tím, že jsme nenašli žádné významné změny pro hodnoty apo B, které odrážejí počet částic VLDL, IDL a LDL.

Zvýšené hladiny plasmatických TAG, které jsme pozorovali u AN, jsou tak pravděpodobně způsobeny sníženým katabolismem VLDL a IDL. Tyto výsledky jsou konsistentní s několika dalšími studiemi^{305,447}. Předpokládaná snížená aktivita apo B/E receptorů, díky sníženým hladinám estrogenů u AN⁴⁴⁸, se také může podílet na zvýšených

koncentracích TAG a VLDL i IDL. Arden a kol.⁴⁴³ popsali dyslipidemii u AN s normálními hladinami TC, zvýšenými hladinami TAG a nízkým HDL-C.

Nejvíce konsistentním nálezem v této studii je pokles zastoupení LA a zvýšení zastoupení POA ve všech lipidových třídách plasmy. Zvýšený ukazatel aktivity D9D (odhadnuta jako poměr produkt/substrát) byl naměřen pro plasmatické CE a PC. Kyselina linolová je nejvíce zastoupenou PUFA plasmatických lipidů⁴³⁹; POA je popisována jako marker lipogenese⁴⁴⁹. Aktivity D9D a synthasy mastných kyselin úzce a významně korelují se stejnými metabolickými a hormonálními stimuly⁴⁵⁰. S přihlédnutím k těmto faktům lze říci, že zvýšené hladiny TAG jsou způsobeny nejen sníženým katabolismem částic LP bohatých na TAG, ale také zvýšenou lipogenesí.

Typická dieta pacientů s AN je nízkokalorická, obzvláště s ohledem na obsah tuku, což má za následek snížený přísun jak n-3, tak n-6 PUFA^{235,440,441}. Snížené koncentrace přírodních antioxidantů a zvýšená lipoperoxidace u různých typů PEM byly už opakovaně popsány⁴⁵¹⁻⁴⁵³. Naše pacientky s AN měly pouze snížené zastoupení LA beze změn v ALA a jiných PUFA. Navíc jsme nepozorovali žádné zásadní změny u elongačních a desaturačních aktivit pro PUFA. Je známo, že LA v porovnání s ALA a jinými n-3 PUFA je více náchylná k lipoperoxidačním změnám⁴⁵⁴. Snížení zastoupení LA je tak způsobeno především zvýšenou oxidační degradací. Redukovaná antioxidační kapacita a snížené hladiny estrogenů mohou také přispívat k tomuto fenomenu u AN⁴⁵⁵.

Naše výsledky jsou principiálně ve shodě s výsledky Holmana a kol.²³⁵ pro hodnoty SFA, MFA a PUFA v jednotlivých lipidových třídách a produktů D9D v CE a PC, přičemž se odlišujeme pouze v hodnotách významnosti. Změny charakteristické pro jednotlivé mastné kyseliny jsou také podobné, ovšem odlišné změny jsme pozorovali u LA, GLA a 20:2n-6. Obě studie se lišily počtem, klinickými charakteristikami nemocných [n = 8 vs. 16, procento ideální tělesné hmotnosti (rozpětí) 68-97 vs. 54 - 89, lipidy plasmy nebyly u studie Holmana a kol. stanoveny] a také statistickým hodnocením výsledků (Studentův t-test vs. Mannův-Whitneyho U-test). V jiné studii²³⁶ bylo studováno 15 pacientů s AN; jejich ideální tělesná hmotnost byla mezi 62 a 98 kg. Autoři studie publikovali snížené zastoupení LA a DHA v PL. Pacienti s méně než 75 procenty ideální hmotnosti měli, mimo sníženého zastoupení LA, také zvýšené zastoupení OA a nezměněný obsah AA. Zvýšený poměr AA/LA tak odráží spíše snížené zastoupení LA než zvýšenou hodnotu elongace a desaturace. Naše studie a zmíněné dvě práce^{235,236} našly pouze malé rozdíly mezi zastoupeními jednotlivých mastných kyselin. Tyto rozdíly mohou pocházet z různých počtů a klinických charakteristik pacientů, a také od rozdílné metodologie a statistického zpracování. Všechny tři studie se zabývají relativním

zastoupením mastných kyselin; elongační a desaturační aktivity jsou odvozenými parametry, které nemohou odrážet reálné koncentrace a aktivity enzymů.

Závěr

Změny v plasmatických lipidech a LP u AN jsou pravděpodobně spojeny se zvýšenou lipogenesí a absorpcí exogenního cholesterolu, sníženým katabolismem LP bohatých na TAG a normální úrovní biosynthesy cholesterolu. Změny v profilu mastných kyselin jsou výsledkem složitých mechanismů zahrnujících nízký dietní příjem PUFA, zřejmě zvýšenou lipoperoxidaci a D9 desaturaci v důsledku nutričních a hormonálních změn. Pro pochopení problematiky metabolismu lipidů a mastných kyselin u AN bude nutné uskutečnit detailnější studie, jež zahrnou náležitější parametry jako absolutní koncentrace mastných kyselin, přímé stanovení aktivit desaturas a elongas, přímou analýsu markerů lipoperoxidace a také polymorfismy genů LP metabolismu.

3.3.2 Mastné kyseliny a necholesterolové steroly u proteino-energetické malnutrice – Studie VII

(Studie byla publikována v článku A. Žák, F. Novák jr., E. Tvrzická, E. Meisnerová, B. Staňková, M. Vecka: Složení plasmatických lipoproteinů u proteino-energetické malnutrice. Sborník Symposia Atherosklerosa – diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku. Praha 15.9.-17.9.2004 ISBN 80-239-3523-2, 168-174)

Proteino-energetická malnutrice představuje kontinuum mezi prostým hladověním (marasmus) a proteinovou malnutricí (kwashiorkor, stresové hladovění). Jedná se o onemocnění, které mají relativně vysokou prevalenci a významně zvyšují mortalitu a morbiditu komplikujících chorob^{456,457}. Ačkoliv odchylky lipidového a LP metabolismu jsou u osob s PEM relativně časté a důležité^{458,459}, parametry lipidové a LP nepatří do palety standardně vyšetřovaných analytů těchto onemocnění^{460,461}. Cílem naší studie bylo tedy sledovat vliv PEM na parametry lipidového metabolismu.

Materiál a metody

Skupina PEM zahrnovala 22 osob (12 M/10 F); kontrolní skupina (KON) 35 zdravých jedinců (10 M/25 F). V případě PEM se jednalo se o pacienty IV. interní kliniky, kteří byli konsekutivně vyšetřeni a hospitalisováni na klinice. Protokol studie lze nalézt v kapitole 2.5.

Nemocní byli vyšetřeni do 3 dnů po přijetí na kliniku, po adekvátní rehydrataci⁴⁶² a před započítím systematické nutriční podpory. Všichni nemocní byli podrobně klinicky a antropometricky vyšetřeni.

Výsledky

Demografická data obou sledovaných skupin jsou uvedena v tabulce 3.3.2.1. Pacienti s PEM byli v průměru o 27 let starší ($P < 0,001$), měli významně nižší tělesnou hmotnost, absolutní i relativní množství tuku a tukuprostou hmotnost ($P < 0,05$ až $P < 0,001$).

Tabulka 3.3.2.1 Demografická data souborů

Parametr	Kontrolní skupina (n = 35)	PEM (n = 22)
věk (roky)	24,9 ± 0,8 ^a	52,6 ± 2,8 ^{*** b}
tělesná hmotnost (kg)	62,2 ± 2,0	55,9 ± 3,5
BMI (kg/m ²)	21,6 ± 0,4	19,1 ± 0,9 ^{**}
hmotnost tuku (kg)	14,9 ± 0,9	10,1 ± 1,6 ^{**}
procento tuku (antropometricky)	23,9 ± 1,1	16,1 ± 1,6 ^{***}
tukuprostá hmotnost (kg)	47,3 ± 1,6	47,7 ± 3,4
obvod pasu (cm)	73,32 ± 1,61	78,45 ± 2,59 [*]
poměr obvodu pasu a boků (1)	0,80 ± 0,02	0,89 ± 0,02 ^{**}
obvod paže (cm)	25,6 ± 0,5	23,19 ± 1,1

a/ průměr ± SEM; b/ Mannův-Whitnevho U-test: * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$.

Biochemické parametry jsou uvedeny v [tabulce 3.3.2.2](#). Skupina PEM měla statisticky významně zvýšené jaterní enzymy (ALT, GMT, ALP), ureu, a reaktanty akutní fáze. Obraz doplňoval zvýšený katabolický index a PINI (Prognostic Inflammatory and Nutritional Index). Významně snížené byly hodnoty celkové bílkoviny, albuminu, prealbuminu a cholinesterasy.

Tabulka 3.3.2.2 Biochemické parametry

Parametr	Kontrolní skupina (n = 35)	PEM (n = 22)
bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	11,31 \pm 0,69	9,45 \pm 1,58
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	0,38 \pm 0,03	0,62 \pm 0,12 *
AST ($\mu\text{kat/l}$)	0,45 \pm 0,04	0,77 \pm 0,28
GMT ($\mu\text{kat/l}$)	0,26 \pm 0,02	1,19 \pm 0,27 ***
ALP ($\mu\text{kat/l}$)	1,08 \pm 0,06	1,85 \pm 0,25 **
celková bílkovina (g/l)	79,1 \pm 0,7	64,5 \pm 5,0 ***
albumin (g/l)	46,0 \pm 0,4	29,4 \pm 1,5 ***
prealbumin (g/l)	0,89 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02 ***
cholinesterasa ($\mu\text{kat/l}$)	159,8 \pm 3,5	96,4 \pm 11,5 ***
močovina (mmol/l)	4,31 \pm 0,20	6,72 \pm 0,93 **
kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	85,6 \pm 1,5	82,2 \pm 11,9
CRP (mg/l)	2,9 \pm 0,4	81,4 \pm 25,5***
fibrinogen (g/l)	3,19 \pm 0,17	4,86 \pm 0,21 ***
katabolický index (1) ^a	0,050 \pm 0,002	0,080 \pm 0,010 ***
PINI (1) ^b	0,183 \pm 0,032	50,7 \pm 26,5 **

průměr \pm SEM; Mannův-Whitneyho U-test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; . a- $S_{\text{urea}}/S_{\text{kreatinin}}$; b-PINI (Prognostic inflammatory and nutritional index) = $(\text{CRP} \times \text{orosomukoid}) \times (\text{albumin} \times \text{prealbumin})^{-1}$

Koncentrace LP, lipidových parametrů a sterolů jsou shrnuty v [tabulce 3.3.2.3](#). U pacientů s PEM byly významně snížené koncentrace TC, LDL-C, HDL-C, non-HDL-C a apo A-I. Koncentrace lathosterolu se výrazně nezměnily, ale poměr lathosterol/TC se zvýšil, poměry kampesterol/TC a β -sitosterol/TC byly sníženy (druhý nedosáhl statistické významnosti).

Složení mastných kyselin v hlavních lipidových třídách je uvedeno v [tabulce 3.3.2.4](#). Při vyhodnocení profilu mastných kyselin jednorozměrnou statistickou analýzou bylo nejvíce konsistentním nálezem snížení obsahu MA, LA a ALA, a zvýšení obsahu OA ve všech lipidových třídách. Dále byl ve všech lipidových třídách zvýšen obsah mononenasyčených MFA a snížen obsah PUFA řady n-6 i n-3.

Ve třídě CE byl navíc zjištěn zvýšený obsah POA a kyseliny vakcenové (18:1n-7), a snížený obsah kyselin *cis*-7-hexadecenové (16:1n-9), DPA-3 a DHA. V TAG byl dále zvýšený obsah PA a snížený obsah kyselin 16:1n-9, 20:0, 20:1n-9, 20:2n-6, dihomo- γ -linolenové (20:3n-6), EPA, DPA-3 a DHA. Ve třídě PC byl navíc zvýšený obsah PA.

Tabulka 3.3.2.3 Plasmatické lipidy, lipoproteiny, apolipoproteiny a steroly

Parametr	Kontrolní skupina (n = 35)	PEM (n = 22)
celkový cholesterol (mmol/l)	4,70 ± 0,12	3,45 ± 0,27 ***
triacylglyceroly (mmol/l)	1,05 ± 0,11	1,24 ± 0,09
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,20 ± 0,04	1,02 ± 0,09 *
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,02 ± 0,10	1,87 ± 0,23 ***
non-HDL-cholesterol (mmol/l)	3,49 ± 0,12	2,43 ± 0,25 ***
apolipoprotein B (g/l)	0,73 ± 0,02	0,75 ± 0,06
apolipoprotein A-I (g/l)	1,57 ± 0,03	0,93 ± 0,08 ***
Lipoprotein [a] (g/l)	0,15 ± 0,04	0,24 ± 0,06
NEFA (mmol/l)	0,47 ± 0,05	0,59 ± 0,06
lathosterol/cholesterol (μmol/mmol)	1,06 ± 0,05	1,76 ± 0,31*
kampesterol/cholesterol (μmol/mmol)	3,59 ± 0,21	2,48 ± 0,29 **
β-sitosterol/cholesterol (μmol/mmol)	3,00 ± 0,25	2,65 ± 0,41

průměr ± SEM; Mannův-Whitneyho U-test: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Tabulka 3.3.2.4 Zastoupení mastných kyselin v lipidových třídách plasmy

Mastná kyselina	Cholesteryl estery		Triacylglyceroly		Fosfolipidy	
	kontrolní skupina	PEM + ^b	kontrolní skupina	PEM	kontrolní skupina	PEM +
14:0	0,97 ± 0,06	0,56 ± 0,08*** ^a	1,53 ± 0,14	1,09 ± 0,11*	0,27 ± 0,02	0,20 ± 0,02*
16:0	10,51 ± 0,30	11,29 ± 0,41	21,78 ± 0,56	23,78 ± 0,53*	26,24 ± 0,34	31,11 ± 1,33***
16:1n-9	0,76 ± 0,05	0,60 ± 0,04*	0,94 ± 0,03	0,78 ± 0,05**	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,01
16:1n-7	2,30 ± 0,12	3,44 ± 0,37**	3,45 ± 0,18	3,67 ± 0,34	0,62 ± 0,03	0,72 ± 0,10
18:0	2,27 ± 0,11	1,02 ± 0,16***	3,33 ± 0,14	3,19 ± 0,21	13,79 ± 0,22	14,38 ± 0,77
18:1n-9	16,98 ± 0,34	21,38 ± 0,54***	39,68 ± 0,59	42,81 ± 0,82**	10,60 ± 0,23	12,38 ± 0,65**
18:1n-7	1,37 ± 0,03	1,72 ± 0,08***	3,14 ± 0,11	2,95 ± 0,21	2,11 ± 0,06	2,07 ± 0,13
18:2n-6	53,47 ± 0,73	48,68 ± 1,27***	19,97 ± 0,85	16,83 ± 1,12*	25,28 ± 0,55	19,94 ± 0,83***
18:3n-6	0,84 ± 0,04	0,95 ± 0,12	0,45 ± 0,03	0,46 ± 0,11	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02
18:3n-3	0,78 ± 0,03	0,53 ± 0,04***	1,74 ± 0,10	0,90 ± 0,11***	0,33 ± 0,01	0,21 ± 0,02***
20:3n-6	0,67 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,02*	2,90 ± 0,09	2,83 ± 0,20
20:4n-6	7,19 ± 0,25	7,65 ± 0,35	1,44 ± 0,07	1,54 ± 0,14	10,82 ± 0,30	10,34 ± 0,56
20:5n-3	0,75 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,23 ± 0,02	0,17 ± 0,03*	0,81 ± 0,05	0,67 ± 0,07
22:5n-3	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01***	0,41 ± 0,02	0,28 ± 0,02***	1,06 ± 0,04	0,83 ± 0,05
22:6n-3	0,65 ± 0,03	0,47 ± 0,04**	0,54 ± 0,04	0,42 ± 0,04*	3,49 ± 0,16	3,04 ± 0,15
Σ SFA	13,84 ± 0,42	12,92 ± 0,55	26,70 ± 0,70	28,15 ± 0,56	40,36 ± 0,31	45,74 ± 1,98**
Σ MFA	21,47 ± 0,44	27,16 ± 0,88***	47,53 ± 0,75	50,47 ± 1,05*	13,70 ± 0,28	15,52 ± 0,84*
Σ PUFA n-6	62,37 ± 0,74	58,23 ± 1,27**	22,84 ± 0,90	19,60 ± 1,10*	40,16 ± 0,41	34,23 ± 1,34***
Σ PUFA n-3	2,32 ± 0,07	1,69 ± 0,09***	2,92 ± 0,14	1,77 ± 0,11***	5,78 ± 0,19	4,61 ± 0,25***

průměr ± SEM (mol %), ^{a/} Mannův-Whitneyho U-test: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; ^{b/} - Hottelingův mnohonásobný t-test: * P < 0,05

Diskuse

Koncentrace TC je až z 90 % sumou cholesterolu obsaženého převážně v LP třídách LDL (včetně IDL) a HDL. Distribuce cholesterolu v LP třídách je výsledkem faktorů genetických,

nutričních a metabolických. Je řízena rychlostí syntézy prekursorových LP, aktivitami enzymů - lipoproteinové lipasy, jaterní lipasy, LCAT, CETP, přenašečového proteinu pro fosfolipidy, aktivitami a počtem receptorů pro LP (LDL-receptor, SR-B1), rychlostí konverze cholesterolu na žlučové kyseliny a jeho eliminace do žluče⁴⁶³. Protože poměr lathosterol/TC je jedním z ukazatelů syntézy cholesterolu *de novo*, lze předpokládat, že zvýšený pokles TC (resp. LDL-C a non-HDL-C) při zvýšené biosyntéze cholesterolu u PEM je způsoben jeho zvýšenou potřebou v reparujících se periferních tkáních.

Klinické stavy, které se zahrnují do skupiny PEM, jsou kombinací prostého (marantického) hladovění a stresového hladovění (resp. cytokiny zprostředkované malnutrice), mohou být charakterisovány také jako součást SIRS. Metabolismus lipidů a LP je u těchto stavů (např. trauma, infarkt myokardu, sepse, zánět či velká operace) alterován z hlediska kvalitativního i kvantitativního. Změny lipidů a LP jsou ve většině případů zprostředkovány hormonálními změnami a působením cytokinů^{439,464,465}. Prozánětlivé cytokiny současně aktivují některé enzymy lipogenese a inhibují aktivity LPL kosterního svalstva a tukové tkáně. Tyto změny byly popsány u pacientů po traumatech i akutním infarktu myokardu^{466,467}.

Vzestup koncentrace VLDL v cirkulaci je pravděpodobně také protektivním mechanismem, který neutralisuje bakteriální lipopolysacharidy. Aplikace bakteriálního lipopolysacharidu zvyšuje obsah SM v LDL a pravděpodobně prostřednictvím TNF- α a IL-1 zvyšuje expresi jaterní glukosylceramid synthasy, která produkuje glukosylceramid a vede ke zvýšení aterogenního potenciálu LDL. Akutní stavy jsou provázeny zvýšeným oxidačním stresem, který rovněž je významným faktorem oxidativní modifikace LDL⁴⁶⁸. Za normálního stavu hrají HDL rozhodující roli v reversním transportu cholesterolu a dále plní funkci ochrany LDL a VLDL před oxidativním poškozením. Během SIRS klesají koncentrace HDL, významně se snižuje koncentrace apo A-I a antioxidační kapacita HDL. Ta je důsledkem poklesu aktivit paraoxonasy k téměř nulovým hodnotám. Pokles apo A-I je důsledkem zvýšených koncentrací serového amyloidu A (SAA), který během zánětu vstupuje do HDL. Zde vytěsňuje apo A-I a tím snižuje schopnost HDL transportovat cholesterol⁴⁶⁹. Předpokládá se, že změna složení HDL urychluje jejich katabolismus, ochromuje reversní transport cholesterolu a přesměrovává transport cholesterolu a fosfolipidů nesených v HDL směrem do tkání, ve kterých probíhá obnova buněk⁴⁶⁸.

Změny v plasmatickém profilu lipidů po akutním infarktu myokardu byly spojeny se zvýšením syntézy cholesterolu (poměru lathosterolu/TC). Autoři vysvětlují tyto změny zvýšenou potřebou cholesterolu pro reparaci tkání po ischemickém inzultu³²⁷. Koncentrace

Lp[a] jsou determinovány převážně geneticky, ale u PEM se mohou výrazně měnit, což je v souladu s jeho vlastnostmi jako reaktantem akutní fáze⁴³⁹.

Závěr

Sekundární dyslipidemie u PEM je charakterisována různě vyjádřenou elevací TAG. Ta koreluje se stupněm insulinové resistence, koncentracemi NEFA a úrovní katabolismu v závislosti na působení cytokinů. Dalším charakteristickým rysem je pokles koncentrace HDL-C a LDL-C při zvýšeném poměru lathosterol/TC a tudíž i zvýšené úrovni syntesy cholesterolu. Pokles LDL-C a HDL-C je pravděpodobně důsledkem zvýšené potřeby cholesterolu pro obnovu buněčných membrán periferních tkání. Konsistentní jsou změny dvou entit: vzestup OA a pokles LA, které jsme zjistili ve všech lipidových třídách. Pokles LA by mohl být důsledkem zvýšené lipoperoxidace (i) a/nebo zvýšené potřeby CE v periferních tkáních (ii). Druhý mechanismus je pravděpodobnější vzhledem k poklesu HDL-C a LDL-C, protože CE jsou transportní formou cholesterolu v LDL a HDL. Vzestup OA by mohl být reflektovat zvýšenou lipogenesi. Koncentrace OA jsou ovlivněny především aktivitou D9D a ty úzce korelují s aktivitou synthasy mastných kyselin⁴⁵⁰. Snížené koncentrace ALA jsou pravděpodobně důsledkem sníženého přísunu této mastné kyseliny u PEM a karence PUFA řady n-3⁴⁷⁰.

3.3.3 Obsah tuku u nízkoenergetických diet a zastoupení mastných kyselin a necholesterolových sterolů v plasmě – Studie VIII

(Část studie byla publikována v článku *Vecka M, Richterová B, Žák A, Tvrzická E, Šrámková P, Staňková B, Klimčáková E, Štich V: Změny složení mastných kyselin v séru a tukové tkáni v závislosti na obsahu tuků v nízkoenergetické dietě. Čas Lék Čes 2006; 145(6): 464-469.*)

V poslední době je opět věnována zvýšená pozornost možnému příznivému vlivu diet s vysokým podílem tuku na redukci váhy a metabolický profil jedince. Diety s vysokým podílem tuků působí, ve srovnání s dietou s nízkým podílem tuků, zvýšený úbytek hmotnosti⁴⁷¹ a snížení hladiny TAG⁴⁷¹, někdy i cholesterolu⁴⁷². O distribuci cholesterolu mezi jednotlivými lipoproteinovými třídami za podmínek redukční diety není mnoho informací a jen velmi málo je známo o homeostase cholesterolu za těchto podmínek⁴⁷³, popř. dlouhodobých účincích takových diet na hladiny lipidů⁴⁷⁴. Složení redukčních diet je navíc velmi variabilní z hlediska obsahu cholesterolu, mastných kyselin a fytoosterolů; všechny tyto složky mají vliv na homeostasu cholesterolu. Cílem této studie bylo sledovat, zdali se odlišný obsah tuků v dietě odrazí v rozdílných změnách ve složení mastných kyselin v lipidech sera (CE, TAG a PL) a v TAG tukové tkáně u obesných osob a také v rozdílném metabolismu cholesterolu.

Metodika

Vyšetřovaný soubor

Vyšetřovaný soubor byl tvořen 44 obesnými osobami bez dalších metabolických komplikací obesity a medikace. Soubor byl randomisován do 2 skupin: 1. skupina s dietou s nízkým zastoupením tuků (LFD), 2. skupina s vysokým zastoupením tuků (HFD). Protokol studie lze nalézt v [kapitole 2.5](#). Zastoupení hlavních tříd mastných kyselin a cholesterolu v přijímané dietě bylo provedeno hodnocením jídelníčku účastníků před zahájením intervence a v 5., 7., a 10 týdnu dietní intervence pomocí programu NutriDan (Müllerová, Plzeň, ČR).

Analytické metody

Pro stanovení biochemických parametrů byl použito postupů uvedených v [kapitole 2.6.1](#). Zastoupení mastných kyselin a necholesterolových sterolů bylo stanoveno podle protokolů uvedených v [kapitolách 2.6.4.1](#) a [2.6.4.2](#). Stanovení zastoupení mastných kyselin v NEFA bylo provedeno po extrakci lipidů metodou přímé derivatisace pomocí monochlorformiátu za katalysy dimethylaminopyridinem v prostředí acetonitrilu a směsi methanolu s dichlormethanem⁴⁷⁵.

Výsledky

Hodnocení zastoupení mastných kyselin a cholesterolu v dietě

Hodnocením jídelníčku bylo zjištěno, že před zahájením diety nebyly mezi oběma

skupinami rozdílly v obsahu tuků a zastoupením hlavních tříd mastných kyselin ve stravě. Během dietní intervence byl u skupiny HFD zjištěn vyšší obsah celkového tuku ($36,2 \pm 5,99$ en% vs. $41,7 \pm 6,31$ en%, $p < 0,005$), u skupiny LFD došlo ke snížení ($39,1 \pm 9,64$ en% vs. $24,8 \pm 5,97$ en%, $p < 0,001$). Během dietní intervence bylo u skupiny HFD zjištěno vyšší zastoupení MFA (HFD: $36,2 \pm 6,22$ en% tuku, LFD: $31,4 \pm 7,1$ en% tuku, $p < 0,05$). Mezi oběma skupinami nebyly rozdíly v procentuálním zastoupení ostatních tříd mastných kyselin v přijímané dietě. Dietní příjem cholesterolu byl stanoven u obou skupin na hodnoty kolem 300 mg/den bez rozdílů způsobených typem diety a fází měření (Tabulka 3.3.3.1).

Vliv diet na antropometrické a metabolické charakteristiky

Vliv obou typů nízkenergetických diet na hmotnostní parametry, hladiny krevních lipidů a lipoproteinů ukazuje Tabulka 3.3.3.1. Mezi oběma skupinami nebyly rozdíly v úbytku celkové tělesné hmotnosti a množství tukové tkáně. Nebyly rozdíly v poklesu hladiny celkového cholesterolu: u skupiny HFD byl způsoben snížením hladiny VLDL-C, zatímco u skupiny LFD především snížením obsahu cholesterolu v částicích LDL.

Tabulka 3.3.3.1 Vliv diety s vysokým a nízkým podílem tuku na antropometrické a vybrané biochemické ukazatele

	HFD (n = 25)		Wilcoxon p	LFD (n = 19)		Wilcoxon p
	před	po		před	po	
energie (kcal/den)	1793 ± 75			1779 ± 64		
příjem cholesterolu (mg/den)	280 ± 70	320 ± 200	0,5079	350 ± 170	292 ± 130	0,5652
váha (kg)	104,8 ± 3,7	97,6 ± 3,5	0,0000	105,2 ± 4,1	97,7 ± 4,2	0,0001
pas (cm)	105,2 ± 2,7	100,9 ± 2,7	0,0020	106,5 ± 2,6	100,0 ± 2,7	0,0001
WHR	0,868 ± 0,019	0,866 ± 0,018	0,8373	0,874 ± 0,029	0,859 ± 0,021	0,0552
FFM (kg)	62,8 ± 2,4	62,0 ± 2,4	0,0030	62,3 ± 2,7	60,1 ± 2,6	0,0004
FM (kg)	42,0 ± 2,2	36,9 ± 2,6	0,0005	43,0 ± 2,8	37,6 ± 2,7	0,0001
FM (% váhy)	39,9 ± 1,3	37,6 ± 1,3	0,0002	40,6 ± 1,7	38,2 ± 1,6	0,0015
TC (mmol/l)	5,31 ± 0,25	5,00 ± 0,23	0,0128	5,17 ± 0,18	4,71 ± 0,16	0,0112
HDL-C (mmol/l)	1,19 ± 0,08	1,17 ± 0,07	0,7570	1,16 ± 0,06	1,08 ± 0,06	0,1031
VLDL-C (mmol/l)	0,47 ± 0,07	0,35 ± 0,03	0,0017	0,35 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,5732
LDL-C (mmol/l)	3,40 ± 0,20	3,31 ± 0,18	0,1985	3,49 ± 0,17	3,08 ± 0,13	0,0055
TAG (mmol/l)	1,61 ± 0,23	1,28 ± 0,14	0,0087	1,27 ± 0,13	1,32 ± 0,09	0,4939
glukosa (mmol/l)	5,56 ± 0,15	5,50 ± 0,11	0,7103	5,34 ± 0,14	5,48 ± 0,11	0,1262
insulin (mU/l)	12,9 ± 2,1	11,3 ± 1,4	0,7164	10,1 ± 1,1	12,4 ± 2,2	0,3144
HOMA index	3,389 ± 0,618	2,862 ± 0,440	0,6377	2,462 ± 0,298	3,112 ± 0,621	0,2560
QUICKI index	0,336 ± 0,007	0,337 ± 0,005	0,7570	0,345 ± 0,009	0,335 ± 0,007	0,3144

průměr ± SEM. Zkratky - WHR (waist:hip ratio) poměr pas/boky, FFM (fat free mass) – tukuprostá hmotnost, FM (fat mass) – hmotnost tuku. HOMA index = $\text{insulin(mU/l)} * \text{glukosa(mmol/l)} / 22,5$; QUICKI index = $1 / [\log(\text{insulin(mU/l)}) + \log(\text{glukosa(mmol/l)} * 18)]$

Změny ve složení mastných kyselin v TAG tukové tkáně

Mastné kyseliny TAG tukové tkáně jsou uvedeny v Tabulce 3.3.3.2. U obou typů diet se

projevilo obdobné snížení zastoupení n-3 PUFA, způsobené snížením zastoupení ALA. Změny v zastoupení MFA byly representovány zvýšením kyseliny 7-hexadecenové (16:1n-9) a OA, kompenzované snížením zastoupení POA: celkově se tyto změny odrazilily v hraničním zvýšení zastoupení MFA u skupiny s LFD a nevýznamně u skupiny s HFD. Žádná z diet nevedla ke změnám v zastoupení nasycených mastných kyselin a minoritních n-6 PUFA.

Tabulka 3.3.3.2 Vliv diety s vysokým a nízkým podílem tuku na složení mastných kyselin triacylglycerolů tukové tkáně

Mastná kyselina	HFD (n = 25)		Wilcoxon p	LFD (n = 19)		Wilcoxon p
	před	po		před	po	
12:0	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,0264	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,1262
14:0	2,02 ± 0,08	1,96 ± 0,08	0,0049	2,17 ± 0,08	2,11 ± 0,09	0,0062
16:0	22,00 ± 0,35	21,85 ± 0,38	0,0653	22,28 ± 0,36	22,05 ± 0,40	0,0158
16:1n-9	0,57 ± 0,01	0,59 ± 0,01	0,0173	0,54 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,0011
16:1n-7	4,47 ± 0,24	4,30 ± 0,27	0,0303	4,03 ± 0,21	3,83 ± 0,21	0,0001
18:0	2,78 ± 0,14	2,82 ± 0,15	0,6766	3,08 ± 0,13	3,15 ± 0,15	0,1262
18:1n-9	49,13 ± 0,34	49,47 ± 0,39	0,0054	49,09 ± 0,39	49,57 ± 0,47	0,0015
18:2n-6	13,16 ± 0,34	13,09 ± 0,33	0,2642	12,82 ± 0,34	12,73 ± 0,37	0,7172
18:3n-3	0,89 ± 0,04	0,84 ± 0,03	0,0003	0,92 ± 0,04	0,87 ± 0,04	0,0008
20:1n-9	0,62 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,0074	0,66 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,0011
20:4n-6	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,0032	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,0401
20:5n-3	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,5629	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,4688
22:6n-3	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,0119	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,0990
Σ SFA	27,17 ± 0,50	26,97 ± 0,54	0,0926	27,97 ± 0,49	27,73 ± 0,58	0,1262
Σ MFA	57,56 ± 0,53	57,78 ± 0,59	0,1155	57,09 ± 0,51	57,41 ± 0,60	0,0642
Σ PUFA n-6	14,09 ± 0,34	14,10 ± 0,33	0,7570	13,71 ± 0,33	13,66 ± 0,36	0,5732
Σ PUFA n-3	1,18 ± 0,04	1,15 ± 0,03	0,0347	1,24 ± 0,04	1,20 ± 0,05	0,0112

Data jsou ve formátu průměr ± SEM. Jsou uvedeny pouze hlavní třídy mastných kyselin a z jednotlivých mastných kyselin pouze hlavní a ty, u nichž byla pozorována změna.

Změny v zastoupení mastných kyselin v krvi

Změny v zastoupení mastných kyselin v jednotlivých lipidových třídách krevního sera ukazují [Tabulky 3.3.3.3 až 3.3.3.5](#).

K největším změnám po dietních režimech došlo ve frakci PL. V obou skupinách diet jsme zaznamenali signifikantní snížení obsahu nasycené mastné kyseliny SA, zvýšení obsahu kyseliny vakcenové (18:1n-7), AA a DHA. V celkových sumách jednotlivých tříd mastných kyselin nedošlo po dietě u žádné skupiny k významným změnám. Změny ve složení NEFA, kde jako majoritní kyseliny vystupují PA (21 -24 mol%), SA (11- 14 mol%), OA (35 – 39 mol%) a LA (12 – 14 mol%), byly pouze nevýznamného charakteru. Jediným zaznamenaným trendem byl u skupin HFD a LFD pokles ALA (z $1,27 \pm 0,06$ na $1,17 \pm 0,07$ mol%, resp. z $1,35 \pm 0,07$ na $1,18 \pm 0,10$ mol%; $p < 0,05$).

Ve frakci CE došlo u skupiny HFD v SFA k signifikantnímu snížení pouze v zastoupení MA. Z mononenasycených mastných kyselin došlo pak k poklesu zastoupení POA i kyseliny

7-hexadecenové, které bylo kompensováno vzestupem obsahu kyseliny vakcenové (18:1n-7): v celkové sumě jsme tak žádnou změnu nepozorovali. U stejné skupiny došlo ve třídě n-6 PUFA ke vzestupu zastoupení AA, jež bylo opět vyrovnáno změnou v opačném smyslu pro GLA a kyselinu dihomog- γ -linolenovou (20:3n-6). Pro poslední třídu PUFA, n-3, byl u skupiny HFD charakteristický pokles u prvního substrátu metabolické dráhy, ALA, a vzestup finálního produktu, DHA, bez efektu na změnu celkového zastoupení n-3 PUFA. Skupina LFD vykázala ve stejném smyslu změny pouze u AA (vzestup), ALA (pokles) a DHA (vzestup), také beze změny celkového zastoupení n-3 PUFA.

Tabulka 3.3.3.3 Vliv diety s vysokým a nízkým podílem tuku na složení mastných kyselin cholesteryl esterů plasmy

Mastná kyselina	HFD (n = 25)		Wilcoxon p	LFD (n = 19)		Wilcoxon p
	před	po		před	po	
14:0	0,76 ± 0,06	0,61 ± 0,05	0,0005	0,80 ± 0,07	0,76 ± 0,09	0,3259
16:0	10,94 ± 0,37	10,79 ± 0,38	0,6476	11,60 ± 0,46	11,83 ± 0,42	0,5014
16:1n-9	0,45 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,0223	0,50 ± 0,05	0,54 ± 0,07	0,5695
16:1n-7	2,81 ± 0,20	2,38 ± 0,17	0,0017	2,52 ± 0,24	2,67 ± 0,23	0,6791
18:0	1,07 ± 0,05	1,01 ± 0,06	0,3313	1,30 ± 0,16	1,30 ± 0,18	0,7174
18:1n-9	17,85 ± 0,37	18,09 ± 0,44	0,4929	17,90 ± 0,56	18,04 ± 0,25	1,0000
18:1n-7	0,93 ± 0,03	1,01 ± 0,03	0,0072	1,03 ± 0,04	1,11 ± 0,04	0,1477
18:2n-6	56,07 ± 0,78	55,85 ± 0,80	0,4405	56,01 ± 0,98	54,14 ± 0,89	0,1208
18:3n-6	0,67 ± 0,04	0,58 ± 0,04	0,0397	0,53 ± 0,06	0,53 ± 0,05	0,5349
18:3n-3	0,58 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,0140	0,48 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,0557
20:3n-6	0,87 ± 0,04	0,80 ± 0,03	0,0010	0,74 ± 0,04	0,76 ± 0,04	0,8361
20:4n-6	4,76 ± 0,22	5,85 ± 0,34	0,0022	4,55 ± 0,48	5,65 ± 0,50	0,0557
20:5n-3	0,28 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,6272	0,23 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,3011
22:6n-3	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,0345	0,14 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,0627
Σ SFA	13,22 ± 0,42	12,82 ± 0,42	0,2531	14,18 ± 0,53	14,38 ± 0,57	0,5695
Σ MFA	22,15 ± 0,50	22,00 ± 0,51	0,6892	22,04 ± 0,75	22,46 ± 0,47	0,7564
Σ PUFA n-6	62,43 ± 0,73	63,14 ± 0,72	0,3914	61,87 ± 1,08	61,14 ± 0,88	0,7564
Σ PUFA n-3	1,15 ± 0,06	1,15 ± 0,07	0,7971	0,97 ± 0,08	1,11 ± 0,10	0,4380
Σ trans	0,77 ± 0,09	0,63 ± 0,04	0,3758	0,64 ± 0,06	0,62 ± 0,06	0,8361
Σ n-9	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,1374	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,7564
Σ18:2conj	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,2904	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,3520

Data jsou ve formátu průměr ± SEM. Jsou uvedeny pouze hlavní třídy mastných kyselin a z jednotlivých mastných kyselin pouze hlavní a ty, u nichž byla pozorována změna. Σtrans = suma trans isomerů mastných kyselin, n-9 - PUFA řady n-9 (20:3n-9). 18:2conj - suma konjugovaných isomerů kyseliny linolové (9c11t, 9t11c, 10t12c, 10c12c, 9t11t atd..)

U TAG došlo u obou skupin ke sníženému zastoupení nasycených mastných kyselin v důsledku snížení zastoupení PA a SA. U skupiny HFD bylo zvýšeno zastoupení mononenasycených mastných kyselin v důsledku zvýšení podílu OA. U PUFA se změny v zastoupení jednotlivých složek vzájemně kompensovaly. Za zmínku stojí také snížení zastoupení *trans*-isomerů mastných kyselin, ke kterému došlo u skupiny LFD.

Tabulka 3.3.3.4 Vliv diety s vysokým a nízkým podílem tuku na složení mastných kyselin fosfolipidů plasmy

Mastná kyselina	HFD (n = 25)		Wilcoxon p	LFD (n = 19)		Wilcoxon p
	před	po		před	po	
16:0	30,61 ± 0,27	31,74 ± 0,30	0,0090	32,21 ± 0,86	32,14 ± 0,54	0,2787
18:0	13,77 ± 0,25	12,88 ± 0,24	0,0008	13,80 ± 0,68	12,61 ± 0,42	0,0030
18:1n-9	9,59 ± 0,24	9,55 ± 0,22	0,8076	9,31 ± 0,46	9,29 ± 0,18	0,8068
18:1n-7	1,31 ± 0,05	1,46 ± 0,04	0,0024	1,39 ± 0,04	1,57 ± 0,06	0,0231
18:2n-6	24,20 ± 0,48	23,19 ± 0,47	0,1886	22,78 ± 0,73	22,33 ± 0,48	0,6002
18:3n-3	0,24 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,0074	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,1520
20:3n-6	3,55 ± 0,16	3,05 ± 0,14	0,0004	3,16 ± 0,25	3,01 ± 0,17	0,4216
20:4n-6	9,07 ± 0,30	10,28 ± 0,38	0,0002	9,35 ± 0,76	10,66 ± 0,39	0,0107
20:5n-3	0,76 ± 0,06	0,69 ± 0,05	0,2627	0,70 ± 0,08	0,74 ± 0,11	0,3454
22:6n-3	2,25 ± 0,13	2,57 ± 0,12	0,0284	2,36 ± 0,24	2,93 ± 0,15	0,0037
Σ SFA	45,41 ± 0,24	45,60 ± 0,24	0,8838	47,17 ± 1,18	45,78 ± 0,33	0,6002
Σ MFA	11,99 ± 0,26	12,06 ± 0,24	0,8583	11,84 ± 0,53	11,94 ± 0,24	0,7532
Σ PUFA n-6	37,67 ± 0,34	37,29 ± 0,31	0,6849	36,03 ± 1,32	36,78 ± 0,36	0,9721
Σ PUFA n-3	3,92 ± 0,17	4,09 ± 0,14	0,3221	3,82 ± 0,36	4,46 ± 0,26	0,1159
Σ trans	0,71 ± 0,05	0,69 ± 0,05	0,1154	0,86 ± 0,07	0,76 ± 0,07	0,1730
Σ n-9	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,0015	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,1159
Σ18:2conj	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,1485	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,2787

Vysvětlivky viz [tabulka 3.3.3.3](#)

Tabulka 3.3.3.5 Vliv diety s vysokým a nízkým podílem tuku na složení mastných kyselin triacylglycerolů plasmy

Mastná kyselina	HFD (n = 25)		Wilcoxon p	LFD (n = 19)		Wilcoxon p
	před	po		před	po	
14:0	1,89 ± 0,11	1,40 ± 0,06	0,0004	1,79 ± 0,10	1,45 ± 0,07	0,0096
16:0	28,40 ± 0,62	26,81 ± 0,43	0,0035	28,36 ± 0,91	25,89 ± 0,44	0,0096
16:1n-7	3,63 ± 0,16	3,31 ± 0,16	0,0138	3,19 ± 0,18	3,41 ± 0,18	0,0854
18:0	3,21 ± 0,14	3,01 ± 0,13	0,0780	3,41 ± 0,21	2,64 ± 0,14	0,0005
18:1n-9	38,51 ± 0,55	40,59 ± 0,55	0,0004	39,11 ± 0,89	40,52 ± 0,50	0,1221
18:2n-6	15,19 ± 0,61	15,81 ± 0,50	0,0653	14,66 ± 1,12	16,56 ± 0,48	0,0854
20:2n-6	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,0128	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,9133
20:3n-6	0,25 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,0049	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,7113
Σ SFA	34,19 ± 0,71	31,84 ± 0,52	0,0019	34,29 ± 1,13	30,63 ± 0,50	0,0018
Σ MFA	45,78 ± 0,53	47,59 ± 0,51	0,0011	46,00 ± 0,93	47,73 ± 0,62	0,0936
Σ PUFA n-6	16,76 ± 0,64	17,38 ± 0,51	0,1578	16,19 ± 1,24	18,16 ± 0,49	0,1701
Σ PUFA n-3	1,55 ± 0,08	1,51 ± 0,09	0,4758	1,45 ± 0,17	1,69 ± 0,12	0,2668
Σ trans	1,34 ± 0,08	1,32 ± 0,08	0,7775	1,70 ± 0,13	1,40 ± 0,11	0,0386
Σ n-9	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,3002	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,5277
Σ18:2conj	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,6766	0,24 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,0222

Vysvětlivky viz [tabulka 3.3.3.3](#)

Změny v necholesterolových sterolech plasmy

Po dietní intervenci poklesly u obou skupin koncentrace fytosterolů ([Tabulka 3.3.3.6](#)). Pokles vztažený na hodnoty cholesterolu dosáhl významnosti u skupiny HFD pouze pro β-sitosterol, u skupiny LFD byla významnost zachována jak pro kampesterol, tak i pro β-sitosterol. Koncentrace lathosterolu nebyly změněny.

Tabulka 3.3.3.6 Vliv diety s vysokým a nízkým podílem tuku na koncentrace necholesterolových sterolů plasmy

Parametr	HFD (n = 25)		Wilcoxon p	LFD (n = 19)		Wilcoxon p
	před	po		před	po	
lathosterol (μmol/l)	7,74 ± 3,08	7,32 ± 3,01	0,7380	7,76 ± 2,57	7,98 ± 3,19	0,7764
kampesterol (μmol/l)	9,01 ± 3,86	7,50 ± 3,22	0,0308	8,51 ± 2,90	6,62 ± 3,54	0,0076
β-sitosterol (μmol/l)	5,96 ± 2,61	4,84 ± 1,90	0,0089	5,47 ± 1,85	4,53 ± 1,94	0,0125
Lathosterol/TC (μmol/mmol)	1,48 ± 0,51	1,50 ± 0,68	0,6051	1,54 ± 0,49	1,73 ± 0,88	0,0884
kampesterol/TC (μmol/mmol)	1,68 ± 0,62	1,47 ± 0,48	0,1711	1,68 ± 0,52	1,39 ± 0,66	0,0106
β-sitosterol/TC (μmol/mmol)	1,12 ± 0,43	0,96 ± 0,29	0,0447	1,09 ± 0,34	0,96 ± 0,37	0,0146

Data jsou ve formátu průměr ± SEM.

Pro výpočet korelačních koeficientů byly zvoleny koncentrace necholesterolových sterolů (lathosterolu, kampesterolu a β-sitosterolu) vztažené na příslušné hodnoty koncentrací cholesterolu (Tabulky 3.3.3.7a a 3.3.3.7b). V obou skupinách jak před intervencí, tak i po dietě, jsme našli významné korelace mezi oběma markery absorpce cholesterolu (kampesterolem β-sitosterolem), lathosterol s těmito dvěma steroly nekoreloval. Významná byla také korelace koncentrací všech tří necholesterolových sterolů naměřených před a po dietní intervenci.

Tabulka 3.3.3.7a Korelace necholesterolových sterolů plasmy vztažených na cholesterol, skupina HFD

Parametr	Lat A / TC A	Kamp A / TC A	Sit A / TC A	Lat B / TC B	Kamp B / TC B	Sit B / TC B
Lat A / TC A		0,0951	-0,0186	0,6579 **	0,0211	-0,0113
Kamp A / TC A	0,0951		0,8518 ****	0,0391	0,5547 *	0,5978 *
Sit A / TC A	-0,0186	0,8518 ****		-0,1227	0,4807	0,6297 **
Lat B / TC B	0,6579 **	0,0391	-0,1227		-0,1964	-0,1872
Kamp B / TC B	0,0211	0,5547 *	0,4807	-0,1964		0,9064 ****
Sit B / TC B	-0,0113	0,5978 *	0,6297 **	-0,1872	0,9064 ****	

Vstupní data jsou v jednotkách μmol/mmol, zkratky – A – před dietou, B – po dietě; Lat – lathosterol, Kamp – kampesterol, Sit – β-sitosterol, TC – cholesterol; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; pořadový Spearmanův koeficient korelace ($n = 25$)

Diskuse

Oba typy diet vedly ke srovnatelnému snížení celkové hmotnosti, úbytku tukové hmoty a ke snížení koncentrace celkového cholesterolu: zatímco u skupiny LFD bylo způsobeno snížením LDL-cholesterolu, u skupiny HFD bylo sníženo zastoupení cholesterolu v částicích VLDL. Na pokles LDL-cholesterolu má vliv snižování tělesné hmotnosti⁴⁷⁶. Snížení hladin cholesterolu u skupiny HFD v částicích VLDL může souviset s poklesem TAG pozorovaným pouze u skupiny HFD. Pokles TAG u diet s vysokým podílem tuků byl též popsán v řadě dalších studií^{365,471}.

Složení mastných kyselin tukové tkáně odráží profil mastných kyselin přijímaných v potravě v delším časovém období, i když v práci Summerse⁴⁷⁷ byl zjištěn rychlý přesun

mastných kyselin z potravy do TAG tukové tkáně. Obě diety v této studii vedly k velké řadě změn v zastoupení jednotlivých mastných kyselin, které se ale neprojevíly v celkových sumách hlavních tříd mastných kyselin. To svědčí spíše pro změny v aktivitách elongačních a desaturačních enzymů spojených se změnami zastoupení mastných kyselin v dietě.

Tabulka 3.3.3.7b Korelace necholesterolových sterolů plasmy vztažených na cholesterol, skupina LFD

Parametr	Lat A / TC A	Kamp A / TC A	Sit A / TC A	Lat B / TC B	Kamp B / TC B	Sit B / TC B
Lat A / TC A		0,3676	0,2794	0,7286 **	0,1857	0,2393
Kamp A / TC A	0,3676		0,8118 ****	0,1393	0,8464 ****	0,7929 ***
Sit A / TC A	0,2794	0,8118 ****		0,0429	0,6321 *	0,6321 *
Lat B / TC B	0,7286 **	0,1393	0,0429		0,0235	0,0735
Kamp B / TC B	0,1857	0,8464 ****	0,6321 *	0,0235		0,9647 ****
Sit B / TC B	0,2393	0,5978 *	0,6321 *	0,0735	0,9647 ****	

Vysvětlivky viz *Tabulka 3.3.3.7a*, $n = 19$.

Snížení zastoupení mastných kyselin řady n-3 v TAG tukové tkáně po nízkenergetické dietě může být způsobeno nízkým obsahem esenciálních mastných kyselin v dietě. Tento efekt byl pozorován i po velmi přísné nízkenergetické dietě^{250,478,479}. Dalším vysvětlením by mohla být zvýšená mobilisace PUFA z tukové tkáně, pro což svědčí výrazně vyšší utilisace počátečních (esenciálních) členů metabolických drah n-3 i n-6 PUFA pro tvorbu následných meziproduktů. Mastné kyseliny řady n-3 se navíc (ve srovnání s ostatními třídami mastných kyselin) ukládají do tukové tkáně nejméně⁴⁷⁷.

Absolutní energetický příjem ve formě tuků byl u obou skupin odhadnut v jiné práci³⁶⁵. Skupina HFD snížila po vstupu do studie příjem energie ve formě tuků z 787 na 648 kcal/den, a LFD na 390 kcal/den. U obou skupin tedy došlo ke snížení příjmu energie ve formě tuků. Bližší pohled na expresi genů v tukové tkáni u některých účastníků studie ukázal, že není rozdílu mezi oběma typy diet, co se týče změn v expresích genů lipidového metabolismu⁴⁸⁰. Tato práce ukázala, že exprese genů zapojených do syntézy PUFA (D5D a D6D) je potlačena u obou typů diet. Při nižším příjmu EFA dochází v tukové tkáni nejdříve k depleci mastných kyselin na počátku metabolické dráhy (ALA, popř. AA) a mastných kyselin využívaných pro tvorbu eikosanoidů (AA a EPA). Po upravení dietního režimu se může změnit poměr n-6/n-3 PUFA ve stravě, na což by upozorňovalo zvýšení obsahu AA při současném snížení obsahu EPA v TAG tukové tkáně u obou skupin.

Koncentrace lathosterolu se po dietě nezměnily. Byla tedy zachována biosynthesa cholesterolu, zřejmě díky kombinaci efektů snížení váhy (snížení hmotnosti biosynthetické tkáně a tedy snížení hladiny lathosterolu⁴⁸¹) a odpovědi na snížení absorpce (kterou je obvykle zvýšení biosynthesy a tím zvýšení hladin lathosterolu).

Snížení hladin obou fytosterolů jsme pozorovali u obou skupin HFD i LFD. Je možné, že při malém snížení tělesné hmotnosti se nejdříve mění absorpční mechanismy nebo mobilisace fytosterolů z tukové tkáně, což se odrazí v poklesu hodnot obou fytosterolů (kampesterolu i β -sitosterolu). Pro sníženou mobilisaci sterolů z tukové tkáně u redukční diety svědčí i dřívější pozorování Kudchodkara⁴⁸², že hypokalorická dieta (plasmatický TAG snížen o 40 ± 10 %) u HTG obesních mužů neměla vliv na absorpci cholesterolu, ale snížila produkci žlučových kyselin. Velmi hluboká korelace byla patrná v naší studii pro oba fytosteroly mezi sebou, a tento fakt ukazuje na zachování absorpční účinnosti pro kampesterol i β -sitosterol z lumen střeva v průběhu diety.

Negativní korelace lathosterolu a obou fytosterolů nedosáhla statistické významnosti. Buď nebyla u zkoumaných osob ustanovena homeostasa cholesterolu, neboť i 3 měsíce trvající redukční režim nenavodí metabolický stav s ustanovenou homeostasou cholesterolu³¹⁷, např. nestabilními váhovými změnami, nebo se do vztahu absorpce – biosynthesa cholesterolu promítá ještě další efekt, například akumulace sterolů ve zmenšujícím se adipocytu⁴⁸³.

Závěr

Desetitýdenní nízkenergetická redukční dieta vyvolává změny ve složení mastných kyselin v tukové tkáni a plasmě. Většina těchto změn není závislá na podílu tuků v přijímané dietě, i když na základě této studie lze hovořit pouze o podílu tuků v rozmezí 20 % a 45 % energetické hodnoty příjmu. Za významnou změnu je třeba pokládat pokles obsahu PUFA v tukové tkáni při obou typech sledovaných diet. Výsledky studie nasvědčují tomu, že hlavním regulačním faktorem změn složení mastných kyselin je energetický deficit vyvolaný dietou a vlastní zastoupení tuků v redukční dietě hraje menší roli. Desetitýdenní nízkenergetická redukční dieta vyvolává změny v metabolismu cholesterolu i fytosterolů, které jsou způsobeny buď sníženou absorpcí a/nebo zhoršeným obratem fytosterolů z tukové tkáně. Redukční dieta nastavená na podíl tuků v rozmezí 20 % a 45 % energetické hodnoty příjmu, která vyvolá snížení tělesné hmotnosti v řádu procent, nemá vliv na celkovou biosynthesu cholesterolu.

4 OBECNÁ DISKUSE

4.1 Metodické aspekty disertace

Stanovení profilu mastných kyselin v plasmě je neoddělitelnou součástí dietních studií⁴⁸⁴. Rostoucí zájem o některé skupiny mastných kyselin klade vyšší nároky na jejich stanovení, které se pro absolutní data musí opírat o validované postupy⁴⁸⁵. Například PUFA n-3 jsou dietním doplňkem s prokázaným hypocholesterolemickým účinkem. Metodika stanovení mastných kyselin pomocí GC je za dlouhou dobu své existence³³⁷ poměrně podrobně zpracována. Nejoblíbenější je použití split/splitless nástřiku izolované směsi FAME do kapilárních kolon, které se v současné době vyrábějí v širokém rozmezí polarity stacionární fáze a délkách dosahujících až 100 m, takže analýsu lze dobře nastavit podle požadavků na stanovovaný profil mastných kyselin. Při nástřiku split lze vliv parametrů nástřiku, jako průtok spliterem, teploty jehly, konfigurace splitové komůrky na chybu stanovení FAME pomocí GC zanedbat⁴⁸⁶. Naše studie se tedy zaměřily na zpracování vlivů jiných kroků analýsy na celkový výsledek stanovení profilu mastných kyselin v lipidových třídách lidské plasmy.

Ve studii I (kapitola 3.1.1.1) jsme studovali vliv použité kolony a integračního software. Zjišťování přítomnosti minoritních složek ve složitém chromatografickém záznamu vyžaduje spolehlivou konfiguraci metody i dobře vybavený vyhodnocovací software. Rozdíl v zastoupení majoritních mastných kyselin a složek na samé mezi stanovení je přibližně tři řády (studie I, kapitola 3.1.1.1), přičemž i mezi minoritními složkami profilu mastných kyselin v lidské plasmě jsou kyseliny s nepopíratelným klinickým významem, jako např. CLA, *trans*-isomery mastných kyselin, POA i Meadova kyselina (20:3n-9)^{231,484}. Při vyhodnocování minoritních peaků je nutná manuální korekce, přičemž novější software s uživatelsky příjemným prostředím umožňují snadné provádění těchto korekcí. To je důležité pro oddělení peaků, u kterých nelze sestavit jednoduchý rozhodovací proces pro automatické zpracovávání (např. příměs mezi peaky 16:1n-9 a 16:1n-7). V tomto případě by chyba výrazně ovlivnila stanovení těchto dvou kyselin, navíc POA se v některých studiích používá jako marker lipogenese⁴⁴⁹.

U některých studií je možné rozhodovat se mezi analytickou maticí. Ve studii II (kapitola 3.1.1.2) jsme se zaměřili na dvě analytické matrice, a to plasma a LP částice. Metabolismus mastných kyselin v plasmatickém kompartmentu je složitý a v těsném vztahu k metabolismu LP částic²⁰⁷. Dále se zde uplatňuje uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně a jejich vazba na albumin. Rozdíly v zastoupení jednotlivých mastných kyselin lipidových tříd mezi

jednotlivými LP třídami jsou malé⁴⁸⁷. Malé rozdíly jsou zřejmě způsobeny rozsáhlými výměnnými procesy, které zahrnují lipidové třídy TAG a CE (přenášeny CETP) i PL (přenášeny specifickým proteinem) a které zasahují všechny LP třídy. Pozorované rozdíly mezi zastoupením mastných kyselin v LDL a celé plasmě (studie II, kapitola 3.1.1.2) nedosahovaly hodnot rozptylů dat v klinickém souboru. Částice LDL totiž přenášejí nejvíce plasmatických CE i PL⁴⁸⁸. Triacylglyceroly jsou přenášeny nejvíce v částicích VLDL a LDL, přičemž porovnání zastoupení VLDL a LDL pro TAG (studie II, kapitola 3.1.1.2) odhalilo výraznější rozdíly, které pro vícenenasycené mastné kyseliny přesáhly dokonce celkovou chybu metody.

Klinické studie někdy nerozlišují při uvádění zastoupení mastných kyselin pojmy fosfolipid a fosfatidylcholin. Je známo, že PC tvoří většinu PL lidské plasmy a tento fakt se nijak dále nekomentuje, pouze se předpokládá, že zastoupení mastných kyselin nebude odlišné. Podrobnější rozbor stanovení profilu mastných kyselin ve PL v porovnání s majoritní fosfolipidovou třídou, PC, je zpracován ve studii III (kapitola 3.1.1.3). Předpoklad o nahrazení profilu mastných kyselin ve PC jejich zastoupením v (celkovém) fosfolipidu se ukázal jako oprávněný, ale pro některé studie je třeba opatrnosti – např. pokud bychom podrobněji sledovali osud jednotlivých mastných kyselin v lipidových třídách plasmy nebo otázku polohových isomerů lipidových tříd.

Analýsa minoritních sterolů v plasmě je v současné době na pokraji klinického zájmu. Analýsa prekursorů cholesterolu se uplatňuje především při stanovení diagnózy vrozených poruch biosynthesy cholesterolu i cerebrotendinosní xanthomatosy (vedle stanovení 5 α -cholestanolu) a analýsa fytosterolů pro podezření na sitosterolemii (kapitola 1.4.2, kapitola 1.2.2 a ref.⁸⁶). Nedávno se také objevily pokusy o hodnocení funkce jater na základě analýsy necholesterolových sterolů pro stanovení klinického stavu po transplantaci jater⁴⁸⁹ a poměr 5 α -cholestanol/cholesterol, popř. fytosteroly/cholesterol se dá použít jako prediktor účinku hypolipidemické léčby u hypercholesterolemi⁴⁹⁰. Fytosteroly a jejich nasycená analoga, fytostanoly, jsou vhodnými dietními doplňky pro snižování cholesterolu, ale protože současně snižují absorpci lipofilních vitaminů a maximálních účinků se dosahuje již při dávce fytosterolů a fytostanolů okolo 2 g/den, není vhodný jejich vyšší příjem⁴⁹¹. Z klinického hlediska by tedy bylo vhodné monitorovat hladinu fytosterolů v plasmě.

Metodickou částí analýsy necholesterolových sterolů jsme se zabývali ve studii IV (kapitola 3.1.2). Je zde popsán vliv typu nástřiku a následné derivatisace na kalibrační závislosti. Je zde také ukázáno na možnost současného stanovení celkového cholesterolu vzorku společně s necholesterolovými steroly a na vliv jednotlivých kroků analýsy na chybu

stanovení. Splitový způsob nástřiku přináší sice jisté nevýhody, ale ty se acetylací sterolů podařilo částečně odstranit. Oproti stanovení mastných kyselin chromatografický krok zatíží významnou měrou celkovou chybu analýsy (kapitola 3.1.2.3). Uvážíme-li však, že tato chyba je stále v porovnání s rozptylem klinických dat malá, lze konfiguraci metody pro stanovení koncentrace necholesterolových sterolů v plasmě použít.

4.2 Experimentální studie

Některé studie spojují metabolismus cholesterolu a funkce nervové soustavy⁴⁹² a dokonce nízká hladina cholesterolu byla spojena se změnami psychiky lidského jedince⁴⁹³. I když jsou nežádoucí vedlejší účinky hypolipidemických léků s ročním obratem cca 20 miliard dolarů⁴⁹⁴ (data pro rok 2004), pečlivě sledovány, mohly by takové léky, které snižují hladinu cholesterolu, mít nezanedbatelný účinek i na centrální nervovou soustavu. Vliv hypolipidemických přípravků na hladinu mozkových lipidů může vést přes ovlivnění metabolismu cholesterolu mimo nervovou tkáň (studie V, kapitola 3.2). Fenofibrát, který primárně metabolismus cholesterolu neovlivňuje, neměl v této studii na zastoupení lipidových tříd vliv. Molekula cholesterolu (fytoosterolu) zřejmě nějakým způsobem přestupuje hematoencefalickou bariéru, protože při fytoosterolemii byla prokázána akumulace fytoosterolů v mozku myši³³⁰ i člověka³²⁹. Změny v zastoupení cholesterolu v membránách buněk nervové tkáně byly ve studii V (kapitola 3.2) spojeny s opačnými změnami v zastoupení sfingolipidů, což může odrážet snahu buněk zachovat membránovou fluiditu, významný faktor správné funkce biologické membrány.

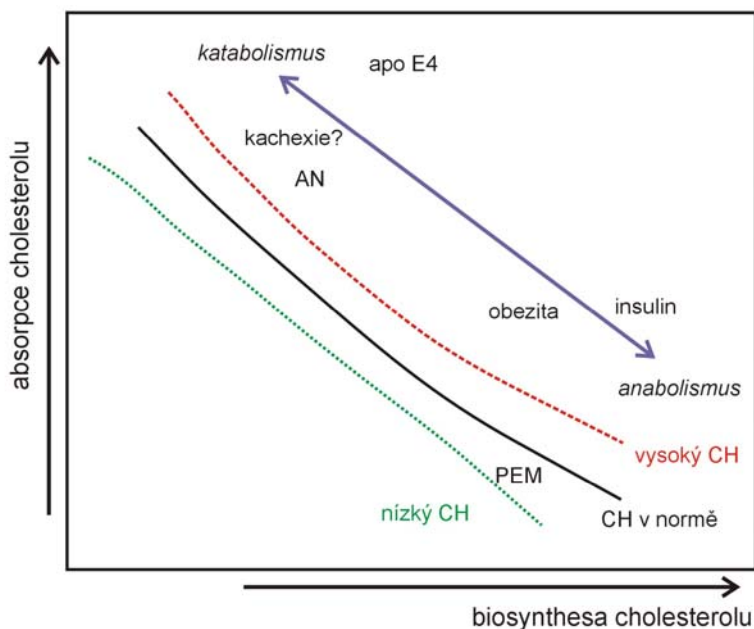
Přestup některých mastných kyselin (DHA a AA) přes hematoencefalickou bariéru je zřejmý, protože tyto mastné kyseliny jsou nezbytně nutné pro správnou funkci mozku⁴³⁵ a savčí organismus není schopen syntézy těchto mastných kyselin v požadovaném množství. Jak zkoumané statiny, tak i fenofibrát (který ovlivňuje metabolismus triacylglycerolů a tedy i mastných kyselin) ve studii V (kapitola 3.2) měly vliv na zastoupení mastných jednotlivých mastných kyselin v lipidových třídách mozku. Například v PE bylo sníženo zastoupení SA a zastoupení DHA bylo po podávání fenofibrátu zvýšeno. Vztah metabolismu mastných kyselin v plasmatickém kompartmentu a membránách mozku bude mít oproti metabolismu cholesterolu složitější podobu, protože jak fibrát, tak statiny ovlivnily do malé míry zastoupení několika mastných kyselin v lipidových třídách mozkové tkáně.

4.3 Klinické studie

Do homeostasy cholesterolu se promítá několik dílčích dějů, především absorpce cholesterolu ve střevě, biosynthesa v játrech (tukové tkáni) a přeměna cholesterolu na žlučové

kyseliny, která je hlavní cestou odbourávání cholesterolu z organismu. Nastavení regulačních pochodů a jejich citlivost je také důsledkem obsahu cholesterolu v játrech⁴⁹⁵. V našich studiích jsme se zaměřili na kvantitativní hodnocení absorpčního a biosynthetického procesu, kterého lze dosáhnout pomocí stanovení necholesterolových sterolů v seru. Obvykle platí negativní korelace mezi markery biosynthesy (lathosterol, desmosterol) a markery absorpce (β -sitosterol a kampesterol)⁸⁷. Pokud tato korelace neplatí, do vztahů vstupuje další faktor, například uvolňování β -sitosterolu a kampesterolu z tukové tkáně při krátkodobé dietní intervenci a homeostasa cholesterolu není ustanovena (Studie VIII, kapitola 3.3.3). Vliv některých faktorů na homeostasu cholesterolu popsanou pomocí vztahu absorpce – biosynthesa je naznačen na Obrázku 4.1.

Obrázek 4.1 Vliv některých faktorů na homeostasu cholesterolu



CH - cholesterol

Změny metabolismu mastných kyselin a cholesterolu za stavů mentální anorexie v některých případech vedou k hypercholesterolemii³⁷⁷ spojené s deficiencí PUFA n-6²³⁵. I když může být za těchto stavů ustavena rovnováha mezi absorpcí a biosyntesou cholesterolu, vyšší hladiny cholesterolu jsou pravděpodobně způsobeny nastavením resorpce exogenního cholesterolu na zvýšenou úroveň (Studie VI, kapitola 3.3.1).

Pacientky měly nezměněnou hodnotu markerů biosynthesy cholesterolu při zvýšené resorpci exogenního cholesterolu. Anorektické stavy s hmotností hluboko pod ideální hodnotou budou spíše energii využívat k absorpci než biosynthesa cholesterolu, která je energeticky náročnější. Zvýšená koncentrace TAG v seru spolu s hypercholesterolemií

naznačuje, že u těchto pacientů dochází ke sníženému katabolismu LP (Studie VI, kapitola 3.3.1).

U skupiny s proteino-energetickou malnutricí jsme zaznamenali nižší BMI (Studie VII, kapitola 3.3.2), což bylo doprovázeno zvýšenou úrovní biosynthesy cholesterolu a zřejmě sníženou resorpcí exogenního cholesterolu. V plasmě byla koncentrace celkového cholesterolu snížena díky snížení hladin LDL a HDL cholesterolu. Ten je zvýšeně utlisován pro obnovu buněčných struktur, dochází k omezení reversního transportu cholesterolu remodelací částic HDL. Pozorovaný snížený poměr apo A-I/HDL-C ($0,92 \pm 0,31$ vs. $1,34 \pm 0,28$ u kontrolní skupiny; $P < 0,0001$ Mannův-Whitneyho test) naznačuje vytěsnění apo A-I proteinem SAA za podmínek zánětlivé odpovědi⁴⁶⁹.

Opačný pól nutričních stavů, obesní jedinci (Studie VIII, kapitola 3.3.3), měli v porovnání s kontrolními skupinami vyšší hodnotu poměru lathosterol/celkový cholesterol ($1,50 \pm 0,40$ vs. $1,06 \pm 0,05$ u kontrolní skupiny; $P < 0,01$; Mannův-Whitneyho test) a nižší hodnotu poměru kampesterol/celkový cholesterol ($1,68 \pm 0,62$ vs. $3,38 \pm 0,31$ u kontrolní skupiny; $P < 0,001$; odráží absorpci exogenního cholesterolu). Obecně je vyšší hmotnost spojena s vyšší biosynthesou cholesterolu jak u nediabetiků²⁹⁷, tak diabetických pacientů s DM 2. typu³²⁰. Insulin dependentní diabetes mellitus je spojen spíše se zvýšenou absorpcí a nižší biosynthesou cholesterolu³²⁰, do vztahu absorpce - biosynthesa je tedy zřejmě zapojen anabolický vliv insulinu a jeho možný vliv na expresi absorpčních mechanismů (NPC1L1). Faktory ovlivňující nastavení homeostasy cholesterolu mají také genetické pozadí, protože míra absorpce cholesterolu vykazuje značnou míru dědivosti⁸⁸ na rozdíl od biosynthesy⁸⁷. Dietní příjem cholesterolu a příjem nasycených mastných kyselin ovlivňuje (v závislosti na nastaveném podílu absorpce) homeostasu cholesterolu⁴⁹⁶. V případě mírného snížení tělesné hmotnosti beze změny koncentrace insulinu u obesních jedinců ke změně biosynthesy cholesterolu nedojde, ale změní se metabolismus fytosterolů, buď v důsledku snížení absorpce a/nebo zhoršené mobilisace z tukové tkáně (Studie VIII, kapitola 3.3.3). Vzhledem k tomu, že obesní patří spíše mezi hypoabsorbéry cholesterolu a dietami nebyl změněn příjem cholesterolu ani nasycených mastných kyselin, lze snížené hladiny fytosterolů připisovat spíše dějům v tukové tkáni (akumulaci fytosterolů v adipocytech, nebo jejich zhoršené mobilisaci).

Za malnutričních stavů i obesity dochází ke komplexním změnám v zastoupení mastných kyselin všech lipidových tříd. Zastoupení mastných kyselin v jednotlivých lipidových třídách plasmy je výsledkem působení mnoha faktorů:

1. LCAT, která hydrolysuje acyly PUFA z *sn*-2 posice PL (PC) a ukládá je do CE, jež jsou hlavní transportní formou cholesterolu u LDL a HDL a obsahují hlavně LA.

2. Výměnné procesy mezi lipoproteiny pomocí transferového proteinu pro PL, CETP, inhibičního proteinu pro transport lipidů.
3. Specifické požadavky některých tkání (např. centrální nervová soustava preferuje DHA a EPA) spojené s metabolickými přeměnami pomocí desaturace, elongace i β -oxidace.
4. Hydrolyza TAG pomocí lipoproteinové a jaterní lipasy, které preferují spíše SFA a MFA.
5. Peroxidační procesy, kterých se účastní především PUFA (LA \gg ostatní PUFA).
6. Vlastní dietní přísun molekul mastných kyselin, hlavně EFA a podmíněně esenciálních.
7. Uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně.

Z výčtu je patrné, že kvantitativní analýsa všech uvedených metabolických drah by narážela na metodickou složitost spojenou s nejistým výsledkem. V klinické studii je možné některé faktory sčítat nebo nepřímo odhadovat (např. vliv celé lipoproteinové kaskády): z výsledků uvedených ve [Studii II, kapitola 3.1.1.2](#), lze usoudit, že zastoupení mastných kyselin v celém plasmatickém kompartmentu a částicích LDL je zhruba stejné, vezmeme-li v úvahu rozptyl dat v klinických souborech. Desaturační, elongační a β -oxidační procesy se mohou odhadnout z poměrů produkt/substrát příslušných metabolických drah ([Obr. 1.1.2 a 1.1.2; studie VI, Tabulka 3.3.1.5](#)) a sum tříd mastných kyselin, úroveň peroxidace mastných kyselin např. stanovením kinetiky konjugovaných dienu v částicích LDL, celkové antioxidační kapacity, popř. stanovením lipidových peroxidů. Proces uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin lze v prvním přiblížení kvantifikovat stanovením koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin v plasmě a dietní přísun hodnotit pomocí dietních dotazníků s vazbou na kvalitní databázi.

Vzájemný vztah mastných kyselin a cholesterolu v plasmě se promítá do několika rovin. Přímo při tvorbě esterů cholesterolu, protože většina cholesterolu v plasmě je ve formě steryl esterů, ve kterých LA tvoří více než polovinu řetězců mastných kyselin. Nepřímý vztah je např. tvorba a remodelace LP částic a výsledky ovlivňování genové exprese i interakce v buněčných membránách ([kapitola 1.3](#)).

Jak PEM, tak AN jsou nutriční a metabolické poruchy spojené s deficiencí EFA²³⁵. U obou skupin jsme skutečně pozorovali nižší zastoupení n-6 PUFA díky nízkému obsahu esenciální mastné kyseliny LA ([Studie VI, kapitola 3.3.1 a Studie VII, kapitola 3.3.2](#)). Za stavu proteino-energetické malnutrice byly pozorovány snížené hladiny LA, které jsou hlavní složkou CE. Pokles zastoupení LA ve všech lipidových třídách by mohl být způsoben vedle zvýšené peroxidace řetězce této mastné kyseliny i zvýšenou utilizací cholesterolu z LP částic v periferních tkáních. Skupina PEM měla též nižší obsah n-3 PUFA (ALA i DHA). Protože u skupiny AN nedošlo ke zvýšenému katabolismu lipoproteinových částic, ale spíše ke

zpomalení katabolických drah, snížené zastoupení LA je způsobeno vedle zvýšeného oxidačního stresu spíše karencí EFA.

Obesní skupina měla též snížené zastoupení n-6 PUFA (LA), ale protože koncentrace TAG a TC (tedy i CE) jsou u obesních jedinců vyšší než u kontrol, koncentrace n-6 mastných kyselin bude u obesních vyšší než u AN a PEM a snížené zastoupení n-6 PUFA bude tedy mít i jiný význam. Za insulinové resistance, jež často doprovází obezitu, je aktivita lipoproteinové lipasy v tukové tkáni (obzvláště viscerální, která je odvozena z hnědé tukové tkáně) nižší. Následně stoupá sekrece VLDL-TAG, částice HDL i LDL jsou bohatší na TAG a tedy lepší substráty pro jaterní lipasu. Ta vytvoří z LDL malé dense částice a sníží počet HDL částic⁴⁹⁷. Jaterní lipasa u PL hydrolyzuje vazbu mastné kyseliny na pozici *sn*-1 (kde jsou spíše MFA a SFA) a tvoří se LPC s mastnou kyselinou na pozici *sn*-2 (více PUFA). Během mírné dietní restrikce je LA β -oxidována podobně jako ostatní PUFA⁴⁹⁸ a nedojde k poklesu relativního zastoupení LA v žádné lipidové třídě, což by odpovídalo výsledku [Studie VIII, kapitola 3.3.3](#). V této studii jsme též nezaznamenali změnu v zastoupení LA v NEFA (data neuvedena).

Zvýšené zastoupení POA v lipidových třídách odráží vyšší úroveň lipogenese, kdežto zvýšené hladiny NEFA jsou známkou zvýšeného uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně. U AN ([Studie VI, kapitola 3.3.1](#)) byly oba tyto parametry zvýšeny, kdežto u PEM ([Studie VII, kapitola 3.3.2](#)) nebylo zvýšené ani zastoupení POA, ani koncentrace NEFA. Zkoumaný soubor s AN vykazoval známky zpomaleného katabolismu LP bohatých na TAG a z literatury je známo, že pacienti s AN mají odlišnou distribuci tukové tkáně od zdravých jedinců. Oproti nim má skupina AN relativně vyšší zastoupení viscerální tukové tkáně a realimentací dojde k relativně většímu přírůstku v porovnání se subkutánní tukovou tkání, takže viscerální tuková tkáň u AN poté váží více než u kontrol ($1,04 \pm 0,50$ vs. $0,59 \pm 0,23$ kg; $P < 0,01$; t-test)⁴⁹⁹.

Koncentrace NEFA jsou u obesních jedinců zvýšené a nízkenergetickými dietami poklesnou směrem k hodnotám kontrol ([Studie VIII, kapitola 3.3.3](#)). Zastoupení POA v lipidových třídách plasmy a TAG tukové tkáně po dietách pokleslo, což by ukazovalo na sníženou lipogenesi. V TAG tukové tkáně současně stoupalo zastoupení OA, která je syntetisována z SA pomocí D9D indukované vyššími hladinami cholesterolu. Při dietě může dojít k akumulaci sterolů (i cholesterolu) v adipocyty ([Studie VIII, kapitola 3.3.3](#)) a tím k indukci D9D. Porovnání profilů NEFA před a po dietách sice neodhalilo vyšší zastoupení OA, ale to může být výsledkem vyššího zastoupení OA v TAG adipocyty, které je vyváženo spíše nižší relativní mobilisací OA vůči jiným mastným kyselinám z TAG⁵⁰⁰.

5 ZÁVĚR

V metodické části disertace byly prozkoumány některé aspekty analýsy mastných kyselin a sterolů pomocí kapilární plynové chromatografie. U analýs mastných kyselin jsme se zaměřili na typ analysované matrice (lipoproteiny plasmy, fosfatidylcholiny i celkové fosfolipidy plasmy) a stanovili jsme omezení metody při stanovení některých mastných kyselin a necholesterolových sterolů. Na základě získaných poznatků byl upraven analytický proces s důrazem na použití těchto analýs pro klinické studie.

Patofysiologické mechanismy zodpovědné za změněné hladiny cholesterolu a mastných kyselin u malnutričních stavů a obesity jsou různé. U mentální anorexie se zřejmě uplatňuje zvýšená resorpce cholesterolu spojená se zpomaleným katabolismem lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly, kdežto u proteino-energetické malnutrice je za nižší zastoupení cholesterolu a esenciálních mastných kyselin v plasmě zodpovědná jejich zvýšená utilisace periferními tkáněmi. Další faktor vstupující do homeostasy cholesterolu a mastných kyselin je tuková tkáň, která se významně uplatňuje za podmínek nízkenergetické diety. Na experimentálním modelu jsme navíc ukázali, že změny koncentrace cholesterolu v plasmě mohou nepřímo zasahovat i do metabolismu cholesterolu a mastných kyselin v nervové tkáni.

6 SOUHRN

Disertační práce se zabývala významem stanovení necholesterolových sterolů a mastných kyselin za různých patofysiologických stavů. Metodická část disertační práce se zabývala některými aspekty analýzy mastných kyselin a necholesterolových sterolů pomocí plynové chromatografie. Pro analýzu minoritních mastných kyselin je důležitý jak druh použité kapilární kolony, tak i možnosti integračního software. Plynová chromatografie přispívá k celkové chybě analýzy mastných kyselin nejmenší měrou. Vliv extrakce, tenkovrstvé chromatografie a methylačního procesu je podobný. Porovnání zastoupení mastných kyselin v lipidových třídách lipoproteinů s velmi nízkou a nízkou hustotou odhalilo rozdíly, které ale byly vysoce individuální. Vyšetření profilu mastných kyselin ve fosfatidylcholiny krevního sera ukázalo, že je možno nahradit fosfatidylcholinu sumou všech fosfolipidů.

U analýzy sterolů byla dána přednost acetylaci pro lepší analytické podmínky za podmínek nástřiku typu split. Současné stanovení necholesterolových sterolů vedle cholesterolu v jediné chromatografické analýze nebylo možné, pro kvantitativní stanovení bylo nutné použít metodu dvou vnitřních standardů a různého ředění vzorku, tj. dvou analýz. Porovnáním příspěvků jednotlivých kroků analýzy necholesterolových sterolů jsme ukázali, že kvantitativní hodnocení lanosterolu a 5 α -cholestanolu je zatíženo chybou vylučující použití této konfigurace analytické metody pro hodnocení klinických vzorků.

Nastavení analytických metod bylo využito v experimentální a klinické části disertace. Experimentální část disertace zkoumala podávání statinů a fibrátu na složení membránových lipidů v mozkové tkáni potkana. Podávání statinů způsobilo snížené zastoupení cholesterolu a difosfatidylglycerolu, které bylo doprovázeno zvýšeným zastoupením sfingolipidů. V zastoupení mastných kyselin nebyly pozorovány význačné změny.

V klinické části disertace byl prozkoumán metabolismus mastných kyselin a cholesterolu za podmínek mentální anorexie, proteino-energetické malnutrice a redukční diety u obesních jedinců. Pacientky s mentální anorexií měly zvýšené koncentrace celkového cholesterolu, triacylglycerolů, HDL-cholesterolu, kampesterolu a β -sitosterolu. Dále jsme pozorovali snížené zastoupení n-6 polynenasycených mastných kyselin ve všech lipidových třídách. Tyto změny jsou výsledkem komplexních mechanismů zahrnujících snížený katabolismus lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly, nezměněnou hladinu biosynthesy cholesterolu a zvýšenou resorpci exogenního cholesterolu

Pacienti s proteino-energetickou malnutricí měli nižší koncentrace celkového cholesterolu i cholesterolu v jednotlivých lipoproteinových třídách a též apo A-I s porovnání s kontrolami.

Biosynthesa cholestesterolu byla zvýšena a absorpce exogenního cholesterolu snížena. Analýza profilu mastných kyselin prokázala zvýšené zastoupení celkových mononenasyčených mastných kyselin a snížené zastoupení n-3 i n-6 polynenasycených mastných kyselin. Metabolické změny jsou za tohoto stavu spojeny spíše se zvýšenou utilisací cholesterolu z lipoproteinových částic v periferních tkáních.

Redukční dieta nastavená na podíl tuků v rozmezí 20 % a 45 % energetické hodnoty příjmu, která vyvolá snížení tělesné hmotnosti u obesních jedinců v řádu procent, nemá vliv na celkovou biosynthesu cholesterolu. Desetitýdenní nízkenergetická redukční dieta vyvolává změny v metabolismu cholesterolu i fytosterolů, které jsou způsobeny buď sníženou absorpcí nebo zhoršeným obratem fytosterolů z tukové tkáně.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Olson R.E.: *J Nutr* **1998**, 128, 439S
2. Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill A.H., et al.: *J Lipid Res* **2005**, 46, 839
3. Christie W.W.: Lipid Nomenclature. <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/nomen/index.htm>. Datum přístupu 3.5.2006.
4. Rangan V.S., Smith S. v knize: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4th Edn.* (Vance D.E., Vance J.E. Eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam **2002**, str. 151-179
5. Christie W.W.: *Lipids* **1998**, 33, 343
6. Jakobsson A., Westerberg R., Jakobsson A.: *Prog Lip Res* **2006**, 45, 237
7. Nakamura M.T., Nara T.Y.: *Annu Rev Nutr* **2004**, 24, 345
8. Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B.(Eds.) v knize: *The Lipid Handbook*, Chapman & Hall, London **1994**
9. Elias P.M., Friend D.S.: *J Cell Biol* **1975**, 65, 180
10. Cunnane S.C., Craig K., Brookes S., Koletzko B., Demmelmair H., et al.: *Lipids* **1995**, 30, 781
11. Salem N. Jr, Litman B., Kim H.-Y., Gawrisch K.: *Lipids* **2001**, 36, 945
12. van Cott E.M., Muszbek L., Laposata M.: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **1997**, 57, 33
13. Kuehl F.A., Jacob T.A., Ganley O.H., Ormond R.E., Meisinger M.A.P.: *J Am Chem Soc* **1957**, 79, 5577
14. Bezuglov V.V., Bobrov M.Y., Archakov A.V.: *Biochemistry (Moscow)* **1998**, 63, 22
15. Guzman M., LoVerme J., Fu J., Oveisi F., Blazquez C., et al.: *J Biol Chem* **2004**, 279, 27849
16. Gelfand E.V., Cannon C.P.: *J Am Coll Cardiol* **2006**, 47, 1919
17. Schmidt A., Vogel R.L., Witherup K.M., Rutledge S.J., Pitzenberger S.M., et al.: *Lipids* **1996**, 31, 1115
18. Gukovskaya A.S., Mouria M., Gukovsky I., Reyes C.N., Kasho V.N., et al.: *Gastroenterology* **2002**, 122, 106
19. Smith W.L., Murphy R.C. v knize: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes 4th Edn.* (Vance D.E., Vance J.E. Eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam **2002**, str. 341-372
20. Sellmayer A., Koletzko B.: *Lipids* **1999**, 34, 199
21. Mukherjee P.K., Marcheselli V.L., Serhan C.N., Bazan N.G.: *Proc Natl Acad Sci U .S. A.* **2004**, 101, 8491
22. Whitehouse A.S., Khal J., Tisdale M.J.: *Br J Cancer* **2003**, 89, 737
23. Whitehouse A.S., Tisdale M.J.: *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, 285, 598
24. Porter N.A., Caldwell S.E., Mills K.A.: *Lipids* **1995**, 30, 277
25. Cracowski J., Durand T., Bessard G.: *Trends Pharmacol Sci* **2002**, 23, 360
26. Roberts L.J., Montine T.J., Markesbery W.R., Tapper A.R., Hardy P., et al.: *J Biol Chem* **1998**, 273, 13605
27. Brame C.J., Salomon R.G., Morrow J.D., Roberts L.J.: *J Biol Chem* **1999**, 274, 13139
28. Torra I.P., Chinetti G., Duval C., Fruchart J.-C., Staels B.: *Curr Opin Lipidol* **2001**, 12, 245
29. Ou J., Tu H., Shan B., Luk A., De Bose-Boyd R.A., et al.: *PNAS* **2001**, 98, 6027
30. Hertz R., Magenheimer J., Berman I., Bar-Tana J.: *Nature* **1998**, 392, 512
31. de Urquiza A.M., Liu S., Sjoberg M., Zetterstrom R.H., Griffiths W., et al.: *Science* **2000**, 290, 2140
32. Zhao A., Ju A., Lew J.L., Huang L., Wright S.D., et al.: *DNA Cell Biol* **2004**, 23, 519
33. Lührs H., Gerke T., Schaubert J., Dusel G., Melcher R., et al.: *Int J Colorectal Dis* **2001**, 16, 195
34. Jump D.B.: *Crit Rev Clin Lab Sci* **2004**, 41, 41
35. Xu J., Teran-Garcia M., Park J.H., Nakamura M.T., Clarke S.D.: *J Biol Chem* **2001**, 276, 9800
36. Prescott S.M., Zimmerman G.A., Stafforini D.M., McIntyre T.M.: *Annu Rev Biochem* **2000**, 69, 419
37. Mizushima Y., Tanaka N., Yagi H., Kurosawa T., Onoue M., et al.: *Biochim Biophys Acta* **1996**, 1308, 256
38. Oda M., Ueno T., Kasai N., Takahashi H., Yoshida H., et al.: *Biochem J* **2002**, 367, 329
39. Evans W.H., Boitano S.: *Biochem Soc Trans* **2001**, 29, 606
40. Huang J.M., Xian H., Bacaner M.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 89, 6452
41. Doolan G.K., Panchal R.G., Fonnes E.L., Clarke A.L., Williams D.A., et al.: *FASEB J* **2002**, 16, 1662
42. Wieland S.J., Gong Q., Poblete H., Fletcher J.E., Chen L.Q., et al.: *J Biol Chem* **1996**, 271, 19037

43. Leaf A.: *Lipids* **2001**, 36 Suppl, S107
44. Willet W.C., Stampfer M.J., Manson J.E., Colditz G.A., Speizer F.E., et al.: *Lancet* **1993**, 341, 581
45. Ascherio A., Rimm E.B., Giovannucci E.L., Spiegelman D., Stampfer M., et al.: *Brit Med J* **1996**, 313, 84
46. Mensink R.P., Katan M.B.: *N Engl J Med* **1990**, 323, 439
47. Aro A. v knize: *Trans fatty acids in human nutrition* (Sébédio J.L., Christie W.W. Eds.) The Oily Press, Dundee **1998**, str. 235-260
48. Corner A.H., Hulan H.W., Nash D.M., Proudfoot F.G.: *Poultry Sci* **1985**, 64, 1438
49. Fenwick G.R., Curtis R.E.: *J Sci Food Agric* **1980**, 31, 515
50. Kickler T.S., Zinkham W.H., Moser A., Shankroff J., Borel J., et al.: *Biochem Molec Med* **1996**, 71, 125
51. Stockler S., Oppper C., Greinacher A., Hunneman D.H., Korenke G.C., et al.: *J Inherit Metab Dis* **1997**, 20, 54
52. van Geel B.M., Assies J., Haverkort E.B., Koelman J.H., Verbeeten B., et al.: *J Neurol Neurosurgery Psych* **1999**, 67, 290
53. Iwakiri Y., Sampson D.A., Allen K.G.: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2002**, 67, 435
54. Yu Y., Correll P.H., Van den Heuvel J.P.: *Biochim Biophys Acta* **2002**, 1581, 89
55. Yurawecz M.P., Hood J.K., Mossoba M.M., Roach J.A., Ku Y.: *Lipids* **1995**, 30, 595
56. Shultz T.D., Chew B.P., Seaman W.R., Luedecke L.O.: *Cancer Lett* **1992**, 63, 125
57. Wang Y.W., Jones P.J.: *Int J Obes Relat Metab Disord* **2004**, 28, 941
58. Domeneghini C., DiGiancamillo A., Corino C.: *Histol Histopathol* **2006**, 21, 663
59. Pherolist: Databáze chemických látek identifikovaných v sexuálních žlázách feromonů hmyzu řádu Motýli (Lepidoptera) a dalších látek fungujících jako aktraktanty pro samečky. <http://www.nysaes.cornell.edu/pheronet/index.html>. Datum přístupu 6.11.2002
60. Belury M.A.: *Annu Rev Nutr* **2002**, 22, 505
61. Vance D.E., Van den Bosch H.: *Biochim Biophys Acta* **2000**, 1529, 1
62. Brown M.S., Goldstein J.L.: *Proc Natl Sci U.S.A.* **1999**, 96, 11041
63. IUPAC: Recommendations for the Nomenclature of Steroids. 1989. Rule 3S-1.0. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/steroid/> Datum přístupu 21.8.2006
64. Lipid Molecular Structure Database: http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu/cis888/rehner/search/LMSD_2_4.asp Datum přístupu 1.8.2006
65. Biardi L., Krisans S.K.: *J Biol Chem* **1996**, 271, 1784
66. Kovacs W.J., Olivier L.M., Krisans S.K.: *Prog Lipid Res* **2002**, 41, 369
67. Lusa S., Heino S., Ikonen E.: *J Biol Chem* **2003**, 278, 19844
68. Echevarria F., Norton R.A., Nes W.D., Lange Y.: *J Biol Chem* **1990**, 265, 8484
69. Lange Y., Muraski M.F.: *J Biol Chem* **1987**, 262, 4433
70. Lange Y., Echevarria F., Steck T.L.: *J Biol Chem* **1991**, 266, 1439
71. Johnson W.J., Fischer R.T., Phillips M.C., Rothblat G.H.: *J Biol Chem* **1995**, 270, 25037
72. Adler J.H., Grebenok R.J.: *Lipids* **1995**, 30, 257
73. Duane W.C.: *J Lipid Res* **1995**, 36, 343
74. Goudjil H., Torrado S., Fontecha J., Martinez-Castro I., Fraga J., et al.: *Lait* **2003**, 83, 153
75. Rajaratnam R.A.: *Impact of serum squalene, postprandial lipoproteins, and cholesterol metabolism on coronary artery disease in postmenopausal women. PhD thesis.*, University of Helsinki, Helsinki **2000**
76. Kim J.H., Lee J.N., Paik Y.K.: *J Biol Chem* **2001**, 276, 18153
77. Edwards P.A., Ericsson J.: *Curr Opin Lipidol* **1998**, 9, 433
78. Edwards P.A., Ericsson J.: *Annu Rev Biochem* **1999**, 68, 157
79. Wang J.W., Megha, London E.: *Biochemistry* **2004**, 43, 1010
80. Sever N., Yang T., Brown M.S., Goldstein J.L., De Bose-Boyd R.A.: *Mol Cell* **2003**, 11, 25
81. Radhakrishnan A., Sun L.P., Kwon H.J., Brown M.S., Goldstein J.L.: *Mol Cell* **2004**, 15, 259
82. Kuwabara P.E., Labouesse M.: *Trends Gen* **2002**, 18, 193
83. Parker T.S., McNamara D.J., Brown C., Kolb R., Ahrens E.H. Jr, et al.: *J Clin Invest* **1984**, 74, 795

84. Miettinen T.A.: *J Lipid Res* **1982**, 23, 466
85. Björkhem I., Miettinen T., Reihner E., Ewerth S., Angelin B., et al.: *J Lipid Res* **1987**, 28, 1137
86. Kuksis A.: *J Chromatogr A* **2001**, 935, 203
87. Kempen H.J., de Knijff P., Boomsma D.I., van der Voort H.A., Gevers Leuven J.A., et al.: *Metab Clin Exper* **1991**, 40, 604
88. Berge K.E., von Bergmann K., Lütjohann D., Guerra R., Grundy S.M., et al.: *J Lip Res* **2002**, 43, 486
89. Goodman D.S., Smith F.R., Seplowitz A., Ramakrishnan H.R., Dell R.B.: *J Lip Res* **1980**, 21, 699
90. Dyer R.G., Stewart M.W., Game F.L., Mitcheson J., Alberti K.G.M.M., et al.: *Diab Nutr Metab* **1995**, 8, 234
91. Nanjee M.N., Cooke C.J., Garvin R., Semeria F., Lewis G., et al.: *J Lipid Res* **2001**, 42, 1586
92. Miettinen T.A., Gylling H.: *Atherosclerosis* **2000**, 153, 241
93. Nikkilä K., Rikkonen S., Lindfors M., Miettinen T.A.: *J Lipid Res* **1996**, 37, 2687
94. Meijer G.W., Van der Palem J.G., De Vries H., Kempen H.J., Van der Voort H.A., et al.: *J Lipid Res* **1992**, 33, 281
95. Vuoristo M., Miettinen M.A.: *Am J Clin Nutr* **1994**, 59, 1325
96. Ågren J.J., Tvřzická E., Nenonen M.T., Helve T., Hänninen O.: *Brit J Nutr* **2001**, 85, 137
97. Asplund-Carlson A., Lund E., Björkhem I., Carlson L.A.: *J Int Med* **1999**, 245, 247
98. Vuoristo M., Miettinen T.A.: *Gut* **1986**, 27, 1312
99. Piran U., Nishida T.: *Lipids* **1979**, 14, 478
100. Mori T.A., Croft K.D., Puddey I.B., Beilin L.J.: *Redox Report* **1996**, 2, 25
101. Axelson M.: *J Lipid Res* **1991**, 32, 1441
102. Axelson M., Angelin B., Hillebrant C.G., Reihner E., Einarsson C.: *Biochim Biophys Acta* **1998**, 1394, 153
103. Bourre J.M., Clement M., Gerard D., Legrand R., Chaudiere J.: *J Neurochem* **1990**, 54, 1196
104. Slominski A., Zjawiony J., Wortsman J., Semak I., Stewart J., et al.: *Eur J Biochem* **2004**, 271, 4178
105. Tint G.S., Xu G.R., Batta A.K., Shefer S., Niemann W., et al.: *J Lipid Res* **1990**, 31, 1301
106. Moody J.P., Humphries C.A., Allan S.M., Paterson C.R.: *J Chromatogr* **1990**, 530, 19
107. Byskov A.G., Andersen C.Y., Nordholm L., Thøgersen H., Guoliang X., et al.: *Nature* **1995**, 374, 559
108. Rozman D., Fink M., Fimia G.M., Sassone-Corsi P., Waterman M.R.: *Mol Endocrinol* **1999**, 13, 1951
109. Janowski B.A., Willy P.J., Devi T.R., Falck J.R., Mangelsdorf D.J.: *Nature* **1996**, 383, 728
110. Jin S., Zhang M., Lei L., Wang Ch., Fu M., et al.: *Mol Cell Endocrinol* **2006**, 249, 64
111. Tammi A., Rönnemaa T., Valsta L., Seppanen R., Rask-Nissilä L., et al.: *J Nutr* **001a**, 131, 1942
112. Connor W.E., Lin D.S., Wolf D.P., Alexander M.: *J Lipid Res* **1998**, 39, 1404
113. Connor W.E., Weleber R.G., De Francesco C.A., Lin D.S., Wolf D.P.: *Invest Ophthalmolog Vis Sci* **1997**, 38, 2619
114. Kallio M.J., Siimes M.A., Perheentupa J., Salmenpera L., Miettinen T.A.: *Am J Clin Nutr* **1989**, 50, 782
115. Kritchevsky D., Tepper S.A., Di Tullio N.W., Holmes W.L.: *J Am Oil Chem Soc* **1965**, 42, 1024
116. Fumagalli R., Paoletti R.: *Life Sci* **1963**, 5, 291
117. Miettinen T.A., Tilvis R.S., Kesaniemi Y.A.: *Metabolism* **1989**, 38, 136
118. Salen G., Shefer S., Tint G.S.: *Gastroenterology* **1984**, 87, 276
119. Halperin G., Elisaf M., Leitersdorf E., Harats D.: *J Chromatogr B*, **2000**, 742, 345
120. Seyama Y.: *J Med Food* **2003**, 6, 217
121. Igel M., Giesa U., Lütjohann D., von Bergmann K.: *J Lipid Res* **2003**, 44, 533
122. Tabas I., Feinmark S.J., Beatini N.: *J Clin Invest* **1989**, 84, 1713
123. Gylling H., Vuoristo M., Färkkilä M., Miettinen T.A.: *J Hepatol* **1996**, 24, 444
124. Salen G., Shefer S., Nguyen L., Ness G.C., Tint G.C., et al.: *J Lipid Res* **1992**, 33, 945
125. Grusak M.A., Della Penna D., Welch R.M.: *Nutr Rev* **1999**, 57, S27
126. Havaux M.: *Trends Plant Sci* **1998**, 3, 147

127. Hartmann M.: *Trends Plant Sci* **1998**, 3, 170
128. Hess D. v knize: *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha **1983**, str. 122-125
129. Li J., Chory L.: *J Exp Bot* **1999**, 50, 275
130. Brown G.D.: *Nat Prod Rep* **1998**, 15, 653
131. Schaller H.: *Prog Lipid Res* **2003**, 42, 163
132. Nakajima N., Fujioka S., Tanaka T., Takatsuto S., Yoshida S.: *Phytochemistry* **2002**, 60, 275
133. Arnqvist L., Dutta P.C., Jonsson L., Sitbon F.: *Plant Physiol* **2003**, 131, 1792
134. Schaller H.: *Plant Physiol Biochem* **2004**, 42, 465
135. Morikawa T., Mizutani M., Aoki N., Watanabe B., Saga H., et al.: *Plant Cell* **2006**, 18, 1008
136. Williams C.L., Bollella M.C., Strobino B.A., Boccia L., Campanaro L.: *J Am Coll Nutr* **1999**, 18, 572
137. Denke M.A. v knize: *The Medical Clinics of North America. Lipid Disorders.* (Hunninghake D.B. Ed.), W. B. Saunders Company, Philadelphia **1994**, str. 197-223
138. Ginter E.: *Prakt Lékař* **1996**, 76, 12
139. King I., Childs M.T., Dorsett C., Ostrander J.G., Monsen E.R.: *J Am Diet Assoc* **1990**, 90, 677
140. Pegel K.H.: *South African J Sci* **1997**, 93, 263
141. Haines T.H.: *Prog Lip Res* **2001**, 40, 299
142. de Jong A., Plat J., Mensink R.P.: *J Nutr Biochem* **2003**, 14, 362
143. Clayton P.T., Whitfield P., Iyer K.: *Nutrition* **1998**, 14, 158
144. Fernández C., Suarez Y., Ferruelo A.J., Gomez-Coronado D., Lasuncion M.A.: *Biochem J* **2002**, 366, 109
145. Sanders D.J., Minter H.J., Howes D., Hepburn P.A.: *Food Chem Toxicol* **2000**, 38, 485
146. Wang D.Q.H.: *Ann Hepatology* **2003**, 2, 113
147. Normén L., Dutta P., Lia Å., Andersson H.: *Am J Clin Nutr* **2000**, 71, 908
148. Wang H.H., Afdhal N.H., Gendler S.J., Wang D.Q.: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2004**, 287, G547
149. Altmann S.W., Davis H.R., Zhu L.J., Yao X., Hoos L.M., et al.: *Science* **2004**, 303, 1201
150. Hauser H., Dyer J.H., Nandy A., Vega M.A., Werder M., et al.: *Biochemistry* **1998**, 37, 17843
151. Duan L.P., Wang H.H., Wang D.Q.: *J Lipid Res* **2004**, 45, 1312
152. Field F.J., Born E., Mathur S.N.: *J Lipid Res* **2004**, 45, 905
153. Klett E.L., Lu K., Kosters A., Vink E., Lee M.H., et al.: *BMC Med* **2004**, 2, 5{1}
154. Earl J., Kirkpatrick P.: *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 97
155. Davies J.P., Scott C., Oishi K., Liapis A., Ioannou Y.A.: *J Biol Chem* **2005**, 280, 12710
156. Berge K.E., Tian G.A., Graf A., Yu L., Grishin N.V., et al.: *Science* **2000**, 290, 1771
157. Lu K., Lee M.-H., Patel S.B.: *Curr Opin Lipidol* **2001**, 12, 141
158. Heinemann T., Axtmann G., von Bergmann K.: *Eur J Clin Invest* **1993**, 23, 827
159. Ostlund R.E., McGill J.B., Zeng C.M., Covey D.F., Stearns J., et al.: *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2002**, 282, E911
160. Bosner M.S., Lange L.G., Stenson W.F., Ostlund R.E.: *J Lipid Res* **1999**, 40, 302
161. Pakarinen M.P., Halttunen J., Kuusanmäki P., Lauronen J., Miettinen T.A.: *Lipids* **1998**, 33, 267
162. Field F.J., Mathur S.N.: *J Lipid Res* **1983**, 24, 409
163. Wilson M.D., Rudel L.L.: *J Lipid Res* **1994**, 35, 943
164. Tavani D.M., Nes W.R., Billheimer J.T.: *J Lip Res* **1982**, 23, 774
165. Chang C.T.-Y., Chang C.C.Y., Lin S., Yu C., Li B.-L., et al.: *Curr Opin Lipidol* **2001**, 12, 289
166. Miwa K., Inazu A., Kobayashi J., Higashikata T., Nohara A., et al.: *Clin Sci (Lond)* **2005**, 109, 183
167. Cohen J.C., Pertsemlidis A., Fahmi S., Esmail S., Vega G.L., et al.: *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, 103, 1810
168. Kesaniemi Y.A., Ehnholm C., Miettinen T.A.: *J Clin Invest* **1987**, 80, 578
169. von Bergmann K., Lütjohann D., Lindenthal B., Steinmetz A.: *J Lipid Res* **2003**, 44, 193
170. Kallio M.: *A follow-up study of serum cholesterol and lipoproteins in children: The effect of diet and*

- apolipoprotein E on cholesterol metabolism, tracking, and screening. Academic dissertation.*, University of Helsinki, Helsinki **2001**, str. 17-18
171. Moghadasian M.H.: *Life Sciences* **2000**, 67, 605
 172. Illingworth D.R., Connor W.E., Lin D.S., Di Liberti J.: *Gastroenterology* **1980**, 78, 68
 173. Miettinen T.A., Tilvis R.S., Kesaniemi Y.A.: *Am J Epidemiol* **1990**, 131, 20
 174. Ellegard L., Bosaeus I., Andersson H.: *Eur J Clin Nutr* **2000**, 54, 306
 175. Tilvis R.S., Miettinen T.A.: *Am J Clin Nutr* **1986**, 43, 92
 176. Färkkilä M.A., Tilvis R.S., Miettinen T.A.: *Scand J Clin Lab Invest* **1988**, 48, 715
 177. Vuoristo M., Tilvis R.S., Miettinen M.A.: *Clin Chim Acta* **1988**, 174, 213
 178. Ling W.H., Jones P.J.: *Atherosclerosis* **1995**, 118, 319
 179. Plösch T., Kok T., Bloks V.W., Smit M.J., Havinga R., et al.: *J Biol Chem* **2002**, 277, 33870
 180. Langheim S., Yu L., von Bergmann K., Lütjohann D., Xu F., et al.: *J Lipid Res* **2005**, 46, 1732
 181. Geuken E., Visser D.S., Leuvenink H.G., de Jong K.P., Peeters P.M., et al.: *Hepatology* **2005**, 42, 1166
 182. Viturro E., Farke C., Meyer H.H., Albrecht C.: *J Dairy Sci* **2006**, 89, 553
 183. Hurgoiu V., Marcu A., Sopon E., Olariu M.: *Pediatrie* **1985**, 40, 201
 184. Boberg K.M., Einarsson K., Björkhem I.: *J Lipid Res* **1990**, 31, 1083
 185. Lund E., Boberg K.M., Byström S., Carlström K., Ölund J., et al.: *J Biol Chem* **1991**, 266, 4929
 186. Tomoyori H., Kawata Y., Higuchi T., Ichi I., Sato H., et al.: *J Nutr* **2004**, 134, 1690
 187. Grandgirard A., Martine L., Demaison L., Cordelet C., Joffre C., et al.: *Br J Nutr* **2004**, 91, 101
 188. Becker M., Staab D., von Bergmann K.: *J Pediatr* **1993**, 122, 292
 189. Sbírka Zákonů, 23/2001 Sb., **2001**, Příloha 15
 190. Miettinen T.A., Gylling H.: *Curr Opin Lipidol* **1999**, 10, 9
 191. Jones P.J., Raeni-Sarjaz M., Ntanos F.Y., Vanstone C.A., Feng J.Y., et al.: *J Lipid Res* **2000**, 41, 697
 192. Gylling H., Pyrhönen S., Mäenpää H., Kangas L., Miettinen T.: *J Clin Oncol* **1995**, 13, 2900
 193. Plat J., Mensink R.P.: *Am J Cardiol* **2005**, 96, 15D
 194. Ronco A., De Stefani E., Boffetta P., Deneo-Pellegrini H., Mendilaharsu M., et al.: *Nutr Cancer* **1999**, 35, 111
 195. DeStefani E., Boffetta P., Ronco A.L., Brennan P., Deneo-Pellegrini H., et al.: *Nutr Cancer* **2000**, 37, 140
 196. Ju Y.H., Clausen L.M., Allred K.F., Almada A.L., Helferich W.G.: *J Nutr* **2004**, 134, 1145
 197. Gutendorf B., Westendorf J.: *Toxicology* **2001**, 166, 79
 198. Bouic P.J.D., Lamprecht J.H.: *Altern Med Rev* **1999**, 413, 170
 199. Bouic P.J.D.: *Drug Disc Today* **2002**, 7, 775
 200. Calpe-Berdiel L., Escolà-Gil J.C., Ribas V., Navarro-Sastre A., Garcés-Garcés J., et al.: *Atherosclerosis* **2005**, 181, 75
 201. Pollak O.J.: *Pharmacol Ther* **1985**, 31, 177
 202. Burck P.J., Thakkar A.L., Zimmerman R.E.: *J Reprod Fertil* **1982**, 66, 109
 203. Malini T., Vanithakumari G.: *J Ethnopharmacol* **1991**, 35, 149
 204. Penumetcha M., Khan-Merchant N., Parthasarathy S.: *Lipid Res* **2002**, 43, 895
 205. Landrier J.F., Grober J., Zaghini I., Besnard P.: *Mol Cell Biochem* **2002**, 239, 149
 206. Minich D.M.: *Essential fatty acid absorption and metabolism. Dissertation.* Rijksuniversiteit Groningen, Groningen **1999**
 207. Zhou L., Nilsson Å.: *J Lip Res* **2001**, 42, 1521
 208. Daumerie C.M., Woollett L.A., Dietschy J.M.: *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**, 89, 10797
 209. Dietschy J.M.: *J Nutr* **1998**, 128, 444S
 210. Xie C., Woollett L.A., Turley S.D., Dietschy J.M.: *J Lipid Res* **2002**, 43, 1508
 211. Seo T., Oelkers P.M., Giattina M.R., Worgall T.S., Sturley S.L., et al.: *Biochemistry* **2001**, 40, 4756
 212. Woollett L.A., Dietschy J.M.: *Am J Clin Nutr* **1994**, 60, 991S
 213. Woollett L.A., Spady D.K., Dietschy J.M.: *J Clin Invest* **1992**, 89, 1133

214. Sampath H., Ntambi J.M.: *Lipids* **2005**, *40*, 1187
215. Martínez-González M.A., Bes-Rastrollo M.: *Altern Ther Health Med* **2006**, *12*, 24
216. Fernandez M.L., West K.L.: *J Nutr* **2005**, *135*, 2075
217. Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.D., Katan M.B.: *Am J Clin Nutr* **2003**, *77*, 1146
218. Terpstra A.H.: *Am J Clin Nutr* **2004**, *79*, 352
219. Mensink R.P., Katan M.B.: *Prog Lipid Res* **1993**, *32*, 111
220. Howell T.J., MacDougall D.E., Jones P.J.: *J Lipid Res* **1998**, *39*, 892
221. Moreno J.J.: *Free Radic Biol Med* **2003**, *35*, 1073
222. Yoshikawa T., Shimano H., Yahagi N., Ide T., Amemiya-Kudo M., et al.: *J Biol Chem* **2002**, *277*, 1705
223. Uehara Y., Engel T., Li Z., Goepfert C., Rust S., et al.: *Diabetes* **2002**, *51*, 2922
224. Ikeda I., Konno R., Shimizu T., Ide T., Takahashi N., et al.: *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760*, 800
225. Gibbons G.F.: *Prog Lipid Res* **2003**, *42*, 479
226. Cassera M., Silber A., Gennaro A.: *Biophys Chem* **2002**, *99*, 117
227. Maccarrone M., Navarra M., Catani V., Corasaniti M.T., Bagetta G., et al.: *J Neurochem* **2002**, *82*, 1444
228. Huttner W.B., Schmidt A.: *Curr Opin Neurobiol* **2000**, *10*, 543
229. Gallegos A.M., Atshaves B.P., Storey S.M., Starodub O., Petrescu A.D., et al.: *Prog Lipid Res* **2001**, *40*, 498
230. Martinez M.: *J Inherit Metab Dis* **1995**, *18*, 61
231. Holman R.T.: *J Nutr* **1998**, *128*, 427S
232. Carpenter K.J.: *J Nutr* **2003**, *133*, 3023
233. Cunnane S.C.: *Prog Lip Res* **2003**, *42*, 544
234. Bourre J.M., Dumont O., Durand G.: *Reprod Nutr Dev* **2004**, *44*, 371
235. Holman R.T., Adams C.E., Nelson R.A., Grater S.J., Jaskiewicz J.A., et al.: *J Nutr* **1995**, *125*, 901
236. Langan S.M., Farrell P.M.: *Am J Clin Nutr* **1985**, *41*, 1054
237. Naisberg Y., Modai I., Weizman A.: *Med Hypotheses* **2001**, *56*, 454
238. Holman R.T., Johnson S.B., Mercuri O., Itarte H.J., Rodrigo M.A., et al.: *Am J Clin Nutr* **1981**, *34*, 1534
239. Marin M.C., De Tomas M.E., Mercuri O., Fernandez A., de Serres C.T.: *Am J Clin Nutr* **1991**, *53*, 466
240. Smit E.N.: *Essential fatty acid deficiency in malnourished children. Academic dissertation. Rijksuniversiteit Groningen, Groningen* **2002**
241. Koletzko B., Abiodun P.O., Laryea M.D., Bremer H.J.: *Eur J Pediatr* **1986**, *145*, 109
242. Leichsenring M., Sutterlin N., Less S., Baumann K., Anninos A., et al.: *Acta Paediatr* **1995**, *84*, 516
243. Squali Houssaini F.Z., Foulon T., Iraqi M.R., Payen N., Gros Lambert P.: *Biomed Pharmacother* **1999**, *53*, 278
244. Squali Houssaini F.Z., Foulon T., Payen N., Iraqi M.R., Arnaud J., et al.: *Biomed Pharmacother* **2001**, *55*, 155
245. Marin M.C., Rey G.E., Pedersoli L.C., Rodrigo M.A., de Alaniz M.J.: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2000**, *63*, 385
246. Yazzie D., Van de Jagr D.J., Isichei C., Glew R.H.: *Nutr Res* **1996**, *16*, 1107
247. Decsi T., Molnar D., Koletzko B.: *Lipids* **1996**, *31*, 305
248. Brenner R.R.: *Prog Lip Res* **1981**, *20*, 41
249. Decsi T., Csábi G., Török K., Erhardt E., Minda H., et al.: *Lipids* **2000**, *35*, 1179
250. Phinney S.D., Davis P.G., Johnson S.B., Holman R.T.: *Am J Clin Nutr* **1991**, *53*, 831
251. Rössner S., Waldius G., Björvell H.: *Int J Obesity* **1989**, *13*, 603
252. Phinney S.D.: *Lipids* **1996**, *31*, S271
253. Babin F., Abderrazik M., Favier F., Cristol J.P., Leger C.L., et al.: *Eur J Clin Nutr* **1999**, *53*, 591
254. Solichová D., Melichar B., Bláha V., Klejna M., Vávrová J., et al.: *Clin Biochem* **2001**, *34*, 563
255. Alden P.B., Svingen B.A., Johnson S.B., Konstantinides F.N., Holman R.T., et al.: *Surgery* **1986**, *100*, 671

256. Prabha P.S., Das U.N., Ramesh G., Kumar K.V., Kamalakar V.: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **1991**, 42, 61
257. Cabré E., Gassull M.A.: *Nutrition* **1996**, 12, 542
258. Socha P., Koletzko B., Swiatkowska E., Pawlowska J., Stolarczyk A., et al.: *Acta Paediatr* **1998**, 87, 278
259. Cabré E., Periago J.L., Abad-Lacruz A., Gil A., González-Huix F., et al.: *Am J Gastroenterol* **1988**, 83, 712
260. Chitturi S., Farrell G.C.: *Semin Liver Dis* **2001**, 21, 27
261. Mead J.F.: *J Am Oil Chem Soc* **1980**, 57, 393
262. Takahashi M., Tsuboyama-Kasaoka N., Nakatani T., Ishii M., Tsutsumi S., et al.: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2002**, 282, G338
263. Palozza P., Sgarlata E., Luberto C., Piccioni E., Anti M., et al.: *Am J Clin Nutr* **1996**, 64, 297
264. Borkman M., Chisholm D.J., Furler S.M., Storlien L.H., Kraegen E.W., et al.: *Diabetes* **1989**, 38, 1314
265. MacLean C.H., Mojica W.A., Morton S.C., Pencharz J., Hasenfeld-Garland R., et al.: *Evid Rep Technol Assess [Summ]* **2004**, 89, 35
266. Simopoulos A.P.: *Biomed Pharmacother* **2002**, 56, 365
267. Padley F.B., Gunstone F.D., Harwood J.L. v knize: *The Lipid Handbook 2nd edition* (Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B. Eds.) Chapman & Hall, London **1994**, str. 47-224
268. Ahrens E.H., Blankenhorn D.H., Tsaltas T.T.: *Proc Soc Exp Biol Med* **1954**, 86, 872
269. doporučení ATP I: *Arch Intern Med* **1988**, 148, 36
270. Krauss R.M., Eckel R.H., Howard B., Appel L.J., Daniels S.R., et al.: *Circulation* **2000**, 102, 2296
271. Surai P.F., Sparks N.H.C.: *Trends in Food Science and Technology* **2001**, 12, 7
272. Napier J.A., Beaudoin F., Michaelson L.V., Sayanova O.: *Biochimie* **2004**, 86, 785
273. Alessandri J.-M., Guesnet P., Vancassel S., Astorg P., Denis I., et al.: *Reprod Nutr Dev* **2004**, 44, 509
274. Calder P.C.: *Lipids* **2003**, 38, 343
275. Balk E.M., Lichtenstein A.H., Chung M., Kupelnick B., Chew P., et al.: *Atherosclerosis* **2006**, 189, 19
276. Žák A., Tvrzická E., Zeman M., Vecka M.: *Čas Lék Česk* **2005**, 144, 6
277. Martínez M., Vázquez E., García-Silva M.T., Manzanares J., Bertran J.M., et al.: *Am J Clin Nutr* **2000**, 71, 376S
278. Vancassel S., Durand G., Barthelemy C., Lejeune B., Martineau J., et al.: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2001**, 65, 1
279. European Patent Office : <http://gb.espacenet.com/> publication info: WO2004024136: EPA for treating anorexia and bulimia. Datum přístupu 18.4.2006
280. Moebius F.F., Fitzky B.U., Glossmann H.: *Trends Endocr Metab* **2000**, 11, 106
281. Goldstein J.L., Brown M.S.: *Nature* **1990**, 343, 425
282. Endo A.: *J Lip Res* **1992**, 33, 1569
283. Lindenthal B., Holleran A.L., Aldaghas D.A., Ruan B., Schroepfer G.J. Jr, et al.: *FASEB J* **2001**, 15, 775
284. Van den Bosche H., Willemsens G., Cools W., Cornelissen F., Lauwers W.F., et al.: *Antimicrob Agents Chemother* **1980**, 17, 922
285. Herman G.E.: *Hum Mol Genet* **2003**, 12, R75
286. Kirby J.K.: *Tr Am Ophthal Soc* **1967**, 65, 494
287. Goodman D.S., Avigan J., Wilson H.: *J Clin Invest* **1962**, 41, 962
288. Singh D.K., Porter T.D.: *J Nutr* **2006**, 136, 759S
289. Berthold H.K., Sudhop T., von Bergmann K.: *JAMA* **1998**, 279, 1900
290. Gylling H., Miettinen T.A.: *Diabetes Care* **1997**, 20, 90
291. Hakala K., Vuoristo M., Miettinen T.A.: *Digestion* **1996**, 57, 83
292. Miettinen T.A., Färkkilä M., Vuoristo M., Karvonen A.L., Leino R., et al.: *Hepatology* **1995**, 21, 1261
293. Nikkilä K., Hockerstedt K., Miettinen T.A.: *Hepatology* **1991**, 13, 663
294. Nikkilä K., Hockerstedt K., Miettinen T.A.: *Hepatology* **1992**, 15, 863
295. Rajaratnam R.A., Gylling H., Miettinen T.A.: *J Am Coll Cardiol* **2000**, 35, 1185

296. Sarkkinen E.S., Uusitupa M.I., Gylling H., Miettinen T.A.: *Metabolism* **1998**, 47, 744
297. Stranberg T.E., Salomaa V., Vanhanen H., Miettinen T.A.: *Diabetes* **1996**, 45, 755
298. Sutherland W.H., Robertson M.C., Williamson S.A., Nye E.R.: *Eur J Appl Physiol* **1991**, 63, 119
299. Sutherland W.H., Scott R.S., Lintott C.J., Robertson M.C., Stapely S.A., et al.: *Horm Metab Res* **1992**, 24, 172
300. Vanhanen H.T., Blomquist S., Ehnholm C., Hyvonen M., Jauhiainen M., et al.: *J Lipid Res* **1993**, 34, 1535
301. Pappu A.S., Illingworth D.R.: *Eur J Clin Invest* **1994**, 24, 698
302. Faix D., Neese R., Kletke C., Wolden S., Cesar D., et al.: *J Lipid Res* **1993**, 34, 2063
303. Žák A., Hrubý M., Papežová H., Vecka M., Tvrzická E., et al.: *Sborník symposia ATHEROSKLEROSA* **2000**, 7, 56
304. Weinbrenner T., Zuger M., Jacoby G.E., Herpertz S., Liedtke R., et al.: *Br J Nutr* **2004**, 91, 959
305. Feillet F., Feillet-Coudray C., Bard J., Parra H., Favre E., et al.: *Acta* **2000**, 294, 45
306. Färkkilä M., Miettinen T.A.: *Ann Med* **1990**, 22, 5
307. Galman C., Miquel J.F., Perez R.M., Einarsson C., Stahle L., et al.: *Gastroenterology* **2004**, 126, 741
308. Miettinen T.E., Kesaniemi Y.A., Gylling H., Jarvinen H., Silvennoinen E., et al.: *Hepatology* **1996**, 23, 274
309. Riches F.M., Watts G.F., Naoumova R.P., Kelly J.M., Croft K.D., et al.: *Atherosclerosis* **1997**, 135, 83
310. Prinsen B.H.C.M.T., Romijn J.A., Bisschop P.H., de Barse M.M.J., Barrett P.H.R., et al.: *J Lipid Res* **2003**, 44, 341
311. Larking P.W.: *Prev Med* **1999**, 29, 383
312. Cox C.M., Sutherland W.H., Ball M.J., Mann J.I.: *Eur J Clin Nutr* **1996**, 50, 358
313. Theobald H.E., Chowienczyk P.J., Whittall R., Humphries S.E., Sanders T.A.: *Am J Clin Nutr* **2004**, 79, 558
314. Riches F.M., Watts G.F., Naoumova R.P., Kelly J.M., Croft K.D., et al.: *Int J Obes Relat Metab Disord* **1998**, 22, 414
315. Simonen P., Gylling H., Miettinen T.A.: *Clin Chim Acta* **2002**, 316, 55
316. Riches F.M., Watts G.F., Hua J., Stewart G.R., Naoumova R.P., et al.: *J Clin Endocrinol Metabol* **1999**, 84, 2854
317. Simonen P.P., Gylling H.K., Miettinen T.A.: *Diabetes Care* **2002**, 25, 1511
318. Feillet C., Monnier L.H., Barjon J.N., Perrin M., Descomps B., et al.: *Metabolism* **1994**, 43, 1233
319. Pihlajamäki J., Gylling H., Miettinen T.A., Laakso M.: *J Lipid Res* **2004**, 45, 507
320. Miettinen T.A., Gylling H., Tuominen J., Simonen P., Koivisto V.: *Diabetes Care* **2004**, 27, 53
321. Tammi A., Rönnemaa T., Rask-Nissilä L., Miettinen T.A., Gylling H., et al.: *Ped Res* **2001**, 50, 688
322. Färkkilä M.A., Kaireno K.J., Taavitsainen M.J., Strandberg T.A., Miettinen T.A.: *Clin Sci (Colch)* **1996**, 90, 315
323. Sudhop T., Gottwald B.M., von Bergmann K.: *Metabolism* **2002**, 51, 1519
324. Assmann G., Cullen P., Erbey J., Ramey D.R., Kannenberg F., et al.: *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2006**, 16, 13
325. Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J.: *Science* **2001**, 294, 1866
326. Bakalář B., Hyšpler R., Páchl J., Zadák Z.: *Wien Klin Wochenschr* **2003**, 115, 775
327. Pfohl M., Schreiber I., Liebich H.M., Haring H.U., Hoffmeister H.M.: *Atherosclerosis* **1999**, 142, 389
328. Salen G., Shefer S., Batta A.K., Tint G.S., Xu G., et al.: *J Inherit Metab Dis* **1996**, 19, 391
329. Salen G., Horak I., Rothkopf M., Cohen J.L., Speck J., et al.: *J Lipid Res* **1985**, 26, 1126
330. Jansen P.J., Lütjohann D., Abildayeva K., Vanmierlo T., Plösch T., et al.: *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1761, 445
331. Miettinen T.A., Klett E.L., Gylling H., Isoniemi H., Patel S.B.: *Gastroenterology* **2006**, 130, 542
332. Gylling H., Hallikainen M., Pihlajamäki J., Ågren J., Laakso M., et al.: *J Lipid Res* **2004**, 45, 1660
333. Vuoristo M., Miettinen M.A.: *Gastroenterology* **1985**, 88, 134
334. Gylling H., Miettinen T.: *Clin Chim Acta* **1988**, 178, 41

335. Miettinen T.A., Strandberg T.E., Gylling H.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, 20, 1340
336. James A.T., Martin A.J.P.: *Biochem J* **1952**, 50, 679
337. James A.T., Martin A.J.P.: *Biochem J* **1956**, 63, 144
338. Albertyn D.E., Bannon C.D., Craske J.D., Hai N.T., O'Rourke K.L., et al.: *J Chromatogr* **1982**, 247, 47
339. Iverson J.L.: *J Assoc Offic Anal Chem* **1970**, 53, 1214
340. Ackman R.G., Sipos J.C.: *J Am Oil Chem Soc* **1964**, 41, 377
341. Bannon C.D., Craske J.D., Hilliker A.E.: *J Am Oil Chem Soc* **1985**, 63, 105
342. Eder K., Reichlmayr-Lais A.M., Kirchgessner M.: *J Chromatogr* **1991**, 588, 265
343. Beaumelle B.D., Vial H.J.: *J Chromatogr* **1986**, 356, 187
344. Eder K., Reichlmayr-Lais A.M., Kirchgessner M.: *J Chromatogr* **1992**, 607, 55
345. Muskiet F.A.J., van Doormaal J.J., Martini I.A., Wolthers B.G., van der Slik W.: *J Chromatogr* **1983**, 278, 231
346. Taylor A.J., Pandov H.I., Lawson N.: *Ann Clin Biochem* **1987**, 24, 293
347. Sattler W., Reicher H., Ramos P., Panzenboeck U., Hayn M., et al.: *Lipids* **1996**, 31, 1303
348. Ohta A., Mayo M.C., Kramer N., Lands W.E.M.: *Lipids* **1990**, 25, 742
349. Liebich H.M., Wirth C., Jakober B.: *J Chromatogr B* **1991**, 572, 1
350. Shantha N.C., Ackman R.G.: *J Chromatogr B* **1990**, 533, 1
351. van der Steege G., Muskiet F.A.J., Martini I.A., Hutter N.H., Boersma E.R.: *J Chromatogr* **1987**, 415, 1
352. Phillips K.H., Ruggio D.M., Bailey J.A.: *J Chromatogr B* **1999**, 732, 17
353. Mohamed A.H.S., Pierfrancesco B., Letizia F., Renato M., Claudio C., et al.: *J Chromatogr B* **2006**, 842, 43
354. Shimada K., Mitamura K., Higashi T.: *J Chromatogr A* **2001**, 935, 141
355. Domeño C., Ruiz B., Nerín C.: *Anal Bioanal Chem* **2005**, 381, 1576
356. Vandenneuvel W.J., Gardiner W.L., Horning E.C.: *J Chromatogr* **1967**, 26, 387
357. Tvrzická E., Mareš P. v knize: *Lipid chromatography analysis* (Shibamoto T Ed.), Marcel Dekker Inc., New York **1994**, str. 103-176
358. Lochman T., Roche A., Martorel R. (Eds.) v knize: *Standardization of anthropometric measurements*. Human Kinetics Publishers, Champaign **1989**, str. 39-80
359. Durnin J.V., Womersley J.: *Br J Nutr* **1974**, 32, 77
360. American Psychiatric Association v knize: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edn.*, American Psychiatric Association, Washington **1994**
361. Barendregt K., Soeters P.B. v knize: *Basics in Clinical Nutrition* (Sobotka L. Ed.), Galén, Praha **1999**
362. Brodanová M., Anděl M. v knize: *Infuzní terapie, parenterální a enterální výživa*, Grada Publishing, Praha **1994**
363. Kazda A. v knize: *Biochemické monitorování nemocných v intenzivní a resuscitační péči*. Avicenum, Praha **1986**
364. Wong D.T., Knaus W.A.: *Can J Anaesth* **1991**, 38, 374
365. Petersen M., Taylor M.A., Saris W.H., Verdich C., Toubro S., et al.: *Int J Obes (Lond)* **2006**, 30, 552
366. Štich V., Harant I., De Glisezinski I., Crampes F., Berlan M., et al.: *J Clin Endocrinol Metab* **1997**, 82, 739
367. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S.: *Clin Chem* **1972**, 18, 499
368. Schumaker V.N., Puppione D.L.: *Methods Enzymol* **1986**, 128, 155
369. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley C.M.: *J Biol Chem* **1957**, 226, 497
370. Tvrzická E., Mareš M., Votruba M., Hrabák P.: *J Chromatogr B* **1990**, 530, 424
371. Vecka M.: *Vliv hypolipidemických léků na složení membránových lipidů mozkové tkáně potkana*. Diplomová práce. Přírodovědecká Fakulta UK, Praha **1999**
372. Carlson L.A.: *Clin Chim Acta* **1985**, 149, 89
373. Anděl J. v knize: *Matematická statistika*. SNTL, Praha **1978**, str. 98-114
374. Kuksis A., Myher J.J., Geher K.: *J Chromatogr* **1981**, 224, 1
375. Kuksis A., Myher J.J., Geher K.: *J Chromatogr* **1982**, 230, 231

376. Devitt M.M., Headon D.R.: *Clin Chim Acta* **1986**, 155, 309
377. Gotto A.M. Jr, Pownall H.J. (Eds.) v knize: *Manual of Lipid Disorders. 2nd ed.* Williams & Wilkins, Baltimore **1999**
378. Matusik E.J., Reeves V.B., Flanagan V.P.: *Anal Chim Acta* **1984**, 166, 179
379. Jensen R.G., Clark R.M., Gerrior S.A.: *Lipids* **1979**, 14, 691
380. Moilanen T., Nikkari T.: *Clin Chim Acta* **1981**, 114, 111
381. Tvrzická E., Vecka M., Staňková B., Žák A.: *Anal Chim Acta* **2002**, 465, 337
382. Phillips G.B., Dodge J.T.: *J Lipid Res* **1967**, 8, 676
383. Conquer J.A., Tierney M.C., Zecevic J., Bettger W.J., Fisher R.H.: *Lipids* **2000**, 35, 1305
384. MacGee J., Williams M.G.: *J Chromatogr* **1981**, 205, 281
385. Tvrzická E., Mareš P., Písaříková A., Novaković J., Hrabák P.: *J Chromatogr* **1991**, 530, 231
386. Myher J.J., Kuksis J.: *J Biochem Biophys Methods* **1987**, 15, 111
387. Kuriyama M., Fujiyama J., Kasama T., Osame M.: *J Lip Res* **1991**, 32, 223
388. Shefer S., Salen G., Batta A.K., Honda A., Tint G.S., et al.: *J Clin Invest* **1995**, 96, 1779
389. Hara A., Taketomi T.: *Lipids* **1982**, 17, 515
390. Strott C.A., Higashi Y.: *J Lip Res* **2003**, 44, 1268
391. Chitwood D.J., Lusby W.R.: *Lipids* **1991**, 26, 619
392. Ruan B., Pang J., Wilson W.K., Schroepfer G.J.: *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, 6, 2421
393. Gerst N., Ruan B., Pang J., Wilson W.K., Schroepfer G.J.: *J Lipid Res* **1997**, 38, 1685
394. Metcalfe L.D.: *J Gas Chromatogr* **1963**, 1, 7
395. Kuksis A., Marai L., Gornall D.A.: *J Lipid Res* **1967**, 8, 352
396. Miettinen T.A., Ahrens E.H., Grundy S.M.: *J Lipid Res* **1965**, 6, 411
397. Kuksis A., Myher J.J., Geher K., Hoffman A.G.D., Breckenridge W.C., et al.: *J Chromatogr* **1978**, 146, 393
398. Moghadasian M.H., Frohlich J.J., Scudamore C.H.: *J Clin Pathol* **2002**, 55, 859
399. Wolthers B.G., Walrecht H.T., van der Molen J.C., Nagel G.T., Van Doormaal J.J., et al.: *J Lipid Res* **1991**, 32, 603
400. Kempen H.J.M., Glatz J.F.C., Leuven J.A.G., Voort van Der H.A., Katan M.B.: *J Lipid Res* **1988**, 29, 1149
401. Vgontzas A.N., Kales A., Bixler E.O., Manfredi R.L., Tyson K.L.: *Clin Pharmacol Ther* **1991**, 50, 730
402. Ditschuneit H.H., Kuhn K., Ditschuneit H.: *Eur J Clin Pharmacol* **1991**, 40, S27
403. Nakahara K., Kuriyama M., Sonoda Y., Yoshidome H., Nakagawa H., et al.: *Toxicol Appl Pharmacol* **1998**, 152, 99
404. Reijneveld J.C., Koot R.W., Bredman J.J., Joles J.A., Bar P.R.: *Pediatr Res* **1996**, 39, 1028
405. Staels B. v knize: *Lipids and Vascular Disease* (Betteridge D.J. Ed.), Martin Dunitz Ltd., London **2000**, str. 27-37
406. Schoonjans K., Staels B., Auwerx J.: *J Lipid Res* **1996**, 37, 907
407. Wolf R., Lo Schiavo A., Russo A., De Angelis F., Ruocco V.: *Int J Dermatol* **1999**, 38, 65
408. Lipscombe J., Lewis G.F., Cattran D., Bargman J.M.: *Clin Nephrol* **2001**, 55, 39
409. Schoonjans K., Martin G., Staels B., Auwerx J.: *Curr Opin Lipidol* **1997**, 8, 159
410. Sgro C., Escousse A.: *Terapie* **1991**, 46, 351
411. Broeders N., Knoop C., Antoine M., Tielemans C., Abramowicz D.: *Nephrol Dial Transplant* **2000**, 15, 1993
412. Fujioka T., Nara F., Tsujita Y., Fukushige J., Fukami M., et al.: *Biochim Biophys Acta* **1995**, 1254, 7
413. Krause B.R., Princen H.M.G.: *Atherosclerosis* **1998**, 140, 15
414. Frøyland L., Madsen L., Vaagenes H., Totland G.K., Auwerx J., et al.: *J Lipid Res* **1997**, 38, 1851
415. Alegret M., Verd J.C., Diaz C., Hernandez G., Adzet T., et al.: *Eur J Pharmacol* **1998**, 347, 283
416. Gaw A., Packard C.J., Shepherd J. v knize: *Principles and Treatment of Lipoprotein Disorders* (Schettler G., Habenicht A.J.R. Eds.) Springer-Verlag, Berlin **1994**, str. 341

417. Augé N., Andrieu N., Nègre-Salvayre A., Thiers J.-C., Levade T., et al.: *J Biol Chem* **1996**, 271, 19251
418. Chatterjee S.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1998**, 18, 1523
419. Haines T.H., Dencher N.A.: *FEBS Lett* **2002**, 528, 35
420. Satoh K., Ichihara K.: *Eur J Pharmacol* **1995**, 292, 271
421. Bargossi A.M., Battino M., Gaddi A., Fiorella P.L., Grossi G., et al.: *Int J Clin Lab Res* **1994**, 24, 171
422. Tanaka T., Strauss J.F.: *Endocrinology* **1982**, 110, 1592
423. Dujovne C.A.: *Curr Opin Lipidol* **1997**, 8, 362
424. Saheki A., Terasaki T., Tamai I., Tsuji A.: *Pharm Res* **1994**, 11, 305
425. Wolozin B., Kellman W., Rousseau P., Celesia G.G., Siegel G.: *Arch Neurol* **2000**, 57, 1439
426. Locatelli S., Lütjohann D., Schmidt H.H.-J., Otto C., Beisiegel U., et al.: *Arch Neurol* **2002**, 59, 213
427. Vega G.L., Weiner M.F., Lipton A.M., von Bergmann K., Lütjohann D., et al.: *Arch Neurol* **2003**, 60, 510
428. Jick H., Zornberg G.L., Jick S.S., Seshadri S., Drachman D.A.: *Lancet* **2000**, 356, 1627
429. Kirsch C.H., Eckert G.P., Mueller W.E.: *Biochem Pharmacol* **2003**, 65, 843
430. Colton C.A., Brown C.M., Cook D., Needham L.K., Xu Q., et al.: *Neurobiol Aging* **2002**, 23, 777
431. Beffert U., Danik M., Krzykowski P., Ramassamy C., Berrada F., et al.: *Brain Res Brain Res Rev* **1998**, 27, 119
432. Ness G.C., Miller J.P., Moffler M.H., Woods L.S., Harris H.B.: *Lipids* **1979**, 14, 447
433. Ong W.Y., Hu C.Y., Soh Y.P., Lim T.M., Pentchev P.G., et al.: *Neuroscience* **2002**, 97, 143
434. Pfrieger F.W.: *BioEssays* **2002**, 25, 72
435. Qi K., Hall M., Deckelbaum R.J.: *Curr Opin Clin Nutr Metabol Care* **2002**, 5, 133
436. Innis S.M.: *J Pediatr* **2003**, 143, S1
437. Mordasini R., Klose G., Greten H.: *Metabolism* **1978**, 27, 71
438. Mira M., Stewart P.M., Wizzard J., Abraham S.: *Ann Clin Biochem* **1987**, 24, 29
439. Thompson G.R. v knize: *A Handbook of Hyperlipidaemia*. Current Science Ltd., London **1990**
440. Sharp C.W., Freeman C.P.L.: *Br J Psychiat* **1993**, 162, 452
441. Mehler P.S., Gray M.C., Schulte M.: *J Women's Health* **1997**, 6, 533
442. Crisp A.H., Blendis L.M., Pawan G.L.: *Metabolism* **1968**, 17, 1109
443. Arden M.R., Weiselberg E.C., Nussbaum M.P., Shenker I.R., Jacobson M.S.: *J Adolesc Health Care* **1990**, 11, 199
444. Case T., Lemieux S., Kennedy S.H., Lewis G.F.: *Int J Eat Disord* **1999**, 25, 187
445. Nestel P.S.: *J Clin Endocrinol Metab* **1974**, 38, 325
446. Watts G.F., Chan D.C., Barrett P.H.R., O'Neil F.H., Thompson G.R.: *Atherosclerosis* **2002**, 3, 235
447. Jaguenaud P., Malon D., Cosnes J., Reveillard V., Apfelbaum M., et al.: *Can Nutr Diet* **1996**, 31, 45
448. Campos H., Walsh B.W., Judge H., Sacks F.: *J Clin Endocrinol Metab* **1997**, 82, 3955
449. Aarsland A., Wolfe R.R.: *J Lipid Res* **1998**, 39, 1280
450. Brenner R.O. v knize: *The role of fats in human nutrition*. (Vergroesen A.J., Crawford M. Eds.), Academic Press (Harcourt Brace Jovanovic Publishers), London **1989**, str. 45-79
451. Lenhartz H., Ndasi R., Anninos A., Botticher D., Mayatepek E., et al.: *J Pediatr* **1998**, 132, 879
452. Sive A.A., Subotzky E.F., Malan H., Dempster W.S., Heese H.D.: *Ann Trop Paediatr* **1993**, 13, 33
453. Fechner A., Böhme C.C., Gromer S., Funk M., Schirmer R.H., et al.: *Pediatr Res* **2001**, 49, 237
454. Yazu K., Yamamoto Y., Ukegawa K., Niki E.: *Lipids* **1996**, 31, 337
455. Sack M.N., Rader D.J., Cannon III R.O.: *Lancet* **1994**, 343, 269
456. Bistrian B.R., Blackburn G.L., Vitale J., Cochran D., Naylor J.: *JAMA* **1976**, 235, 1567
457. McWhirter J.P., Pennington C.R.: *BMJ* **1994**, 308, 945
458. Monarque-Favard C., Garcia I., Abidi H., Bannier E., Riviere J., et al.: *J Nutr Health Aging* **2002**, 6, 370
459. Mesotten D., Swinnen J.V., Vanderhoydonc F., Wouters P.J., Van den Berghe G.: *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, 89, 219
460. Sobotka L., Soeters P.B., Pertkiewicz M. v knize: *Basics in clinical nutrition*. Galén, Praha **1999**

461. Zadák Z. v knize: *Výživa v intenzivní péči*. Grada Publishing, Praha **2002**
462. Kavouras S.A.: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2002**, 5, 519
463. Dietschy J.M.: *Am J Clin Nutr* **1997**, 65, 581S
464. Hardardottir I., Grunfeld C., Feingold K.R.: *Curr Opin Lipidol* **1994**, 5, 207
465. Fraunberger P., Pilz G., Cremer P., Werdan K., Walli A.K.: *Shock* **1998**, 10, 359
466. Rosenson R.S.: *J Am Coll Cardiol* **1993**, 22, 933
467. Feingold K.R., Soued M., Adi S., Staprans I., Shigenaga J., et al.: *Diabetes* **1990**, 39, 1569
468. Carpentier Y.A., Scruel O.: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2002**, 5, 153
469. Banka C.L., Yuan T., de Beer M.C., Kindy M., Curtiss L.K., et al.: *J Lipid Res* **1995**, 36, 1058
470. Kinsella J.E., Broughton K.S., Whelan J.W.: *Nutr Biochem* **1990**, 1, 123
471. Foster G.D., Wyatt H.R., Hill J.O., McGuckin B.G., Brill C., et al.: *N Engl J Med* **2003**, 21, 2082
472. Jones P.J.H., Scanu A.M., Schoeller D.A.: *J Lab Clin Med* **1988**, 111, 627
473. Raeini-Sarjaz M., Vanstone C.A., Papamandjaris A.A., Wykes L.J., Jones P.J.: *Am J Clin Nutr* **2001**, 73, 262
474. Avenell A., Broom J., Brown T.J., Poobalan A., Aucott L., et al.: *Health Technol Assess* **2004**, 8, iii-iv,1
475. Hušek P., Šimek P., Tvrzická E.: *Anal Chim Acta* **2002**, 465, 433
476. Dattilo A.M., Kris-Etherton P.M.: *Am J Clin Nutr* **1992**, 56, 320
477. Summers L.K.M., Barnes C., Fielding B.A., Beysen C., Ilic V., et al.: *Am J Clin Nutr* **2000**, 71, 1470
478. Vecka M., Kunešová M., Staňková B., Žák A., Viguierie N., et al.: *Klin Bioch Metabol* **2001**, 9, 119
479. Kunešová M., Phinney S., Hainer V., Tvrzická E., Štich V., et al.: *Int J Obesity* **1998**, 22, S119
480. Dahlman I., Linder K., Arvidsson-Nordström E., Andersson I., Lidén J., et al.: *Am J Clin Nutr* **2005**, 81, 1275
481. Turley S.D., Hansen C.T.: *J Lipid Res* **1986**, 27, 486
482. Kudchodkar B.J., Sodhi H.S., Mason D.T., Borhani N.O.: *Am J Clin Nutr* **1977**, 30, 1135
483. Tilvis R., Miettinen T.A.: *Eur J Clin Invest* **1979**, 9, 155
484. Seppänen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R.: *Anal Chim Acta* **2002**, 465, 39
485. Schreiner M.: *J Chromatogr A* **2005**, 1095, 126
486. Ulberth F., Schrammel F.: *J Chromatogr A* **1995**, 704, 455
487. Goodman D.S., Shiratori T.: *J Lip Res* **1964**, 5, 307
488. Pownall H.J., Gotto A.M. Jr v knize: *Lipoproteins in health and disease* (Betteridge D.J., Illingworth D.R., Shepherd J Eds.), Arnold, London **1999**, str. 1-87
489. Nikkilä K., Miettinen T.A., Höckerstedt K.V.A., Isoniemi H.: *Transplant International* **2005**, 18, 221
490. Hoenig M.R., Rolfe B.E., Campbell J.H.: *Atherosclerosis* **2006**, 184, 247
491. Katan M.B., Grundy S.M., Jones P., Law M., Miettinen T., et al.: *Mayo Clin Proc* **2003**, 78, 965
492. Dietschy J.M., Turley S.D.: *J Lipid Res* **2004**, 45, 1375
493. Papakostas G.I., Ongur D., Iosifescu D.V., Mischoulon D., Fava M.: *Eur Neuropsychopharmacol* **2004**, 14, 135
494. Maggon K.: *Drug Discov Today* **2005**, 10, 739
495. Beynen K.S., Mostad I.L., Thoresen L.: *Am J Clin Nutr* **1980**, 33, 81
496. Berglund L., Hyson D.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**, 23, 1314
497. Lean M.E.J. v knize: *Lipoproteins in health and disease*. (Betteridge D.J., Illingworth D.R., Shepherd J. Eds.), Arnold, London **1999**, str. 881-895
498. Cunnane S.C., Ross R., Bannister J.L., Jenkins D.J.A.: *Am J Clin Nutr* **2001**, 73, 709
499. Mayer L., Walsh T., Pierson R.N., Heymsfield S.B., Gallagher D., et al.: *Am J Clin Nutr* **2005**, 81, 1286
500. Raclot T., Langin D., Lafontan M., Groscolas R.: *Biochem J* **1997**, 324, 911

8 SEZNAM ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová, 20:4n-6
ABC	transportní protein vázající ATP (ATP binding cassette transporter protein)
ACAT	acyl:cholesterol-O-acyltransferasa
ALA	kyselina α -linolenová, 18:3n-3
AN	mentální anorexie (anorexia nervosa)
Apo	apolipoprotein
BBB	hematoencefalická bariéra (blood brain barrier)
BMI	hmotnostní index (body mass index)
CB	kanabinoidní receptor
CE	cholesteryl ester
CETP	cholesteryl ester transportní protein (cholesteryl transfer protein)
CLA	konjugované isomery kyseliny linolové (conjugated linoleic acids)
CMH	ceramid monohexosid
C _n	uhlík na pozici <i>n</i>
CRP	C-reaktivní protein
CYP	cytochrom P450
C- <i>m</i>	sloučenina obsahující v molekule <i>m</i> atomů uhlíku
DAG	diacylglycerol
DHA	kyselina dokosaheptaenová, 22:6n-3
DHCR24	steroidní D24 reduktasa
DM	diabetes mellitus
DPA-3	kyselina dokosapentaenová, 22:5n-3
DPG	difosfatidylglycerol
D5D, D6D, D9D	delta 5 (6,9) desaturasa mastných kyselin
E.C.	označuje použití klasifikačního systému pro enzymy (Viz např. databáze BRENDA http://www.brenda.uni-koeln.de)
EFA	esenciální mastné kyseliny (essential fatty acids – ALA a LA)
EPA	kyselina eikosapentaenová, 20:5n-3
FAME	methylestery mastných kyselin (fatty acid methylesters)
FEN	fenofibrát
FF-MAS	folikulární meiosis aktivující sterol
FLU	fluvastatin
FXR	farnesoidní X receptor
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GLA	kyselina γ -linolenová, 18:3n-6
HDL	lipoproteinové částice o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HDL-C	cholesterol obsažený v částicích HDL
HFD	skupina s dietou obsahující zvýšený podíl tuků (high fat diet)
HMG	3-hydroxy-3-methylglutarová kyselina
HLP	hyperlipoproteinemie
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
HTG	hypertriacylglycerolemie
ChREBP	protein vázající se na responsivní element pro sacharid (carbohydrate-responsive element binding protein)
I-BABP	ileální vazebný protein pro žlučové kyseliny (ileal bile acid binding protein)
IDL	lipoproteinové částice s intermediární hustotou (intermediate density lipoprotein)
ICHS	ischemická choroba srdeční

LA	kyselina linolová, 18:2n-6
LCAT	lecithin:cholesterol acyltransferasa
LDL	lipoproteinové částice s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
LDL-C	cholesterol obsažený v částicích LDL
LFD	skupina s dietou obsahující snížený podíl tuků (low fat diet)
LOV	lovastatin
LP	lipoprotein
LPC	lysofosfatidylcholin
LXR	játerní X receptor (liver X receptor)
MAS	meiosu aktivující steroly
MLN64	protein izolovaný z metastasující lymfatické uzliny při rakovině prsu (metastatic lymph node 64 protein)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MFA	masné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monounsaturated fatty acids)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát (redukovaná forma)
NEFA	neesterifikované masné kyseliny (nonesterified fatty acids)
NFκB	jaderný faktor κB
NIDDM	diabetes 2. typu, insulin non-dependentní diabetes mellitus
NLP	normolipidemie
NPC-1	Niemannův-Pickův protein C1
NPC1L1	protein podobný Niemannovu-Pickovu proteinu C1
OA	kyselina olejová, 18:1n-9
PA	kyselina palmitová, 16:0
PAF	faktor aktivující destičky (platelet activating factor)
PBS	fysiologický roztok s fosfátovým pufrem (phosphate buffered saline)
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidylethanolamin
PEM	proteino-energetická malnutrice
PKC	protein kinasa C
PL	fosfolipidy
POA	kyselina palmitolejová, 16:1n-7
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomálním proliferátorem (peroxisome proliferator activated receptor)
PRA	pravastatin
PUFA	vícenenasycené masné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku (reactive oxygen species)
RRT	relativní retenční čas (relative retention time)
RSD	relativní standardní odchylka (relative standard deviation)
RXR	retinoidní X receptor
SA	kyselina stearová, 18:0
SAA	serový amyloid A
SCAP	aktivační protein pro štěpení SREBP
SCP-2	protein transportující steroly 2 (sterol carrier protein-2)
sD7R	steroidní D7 reductasa
SFA	nasycené masné kyseliny (saturated fatty acids)
SFT	tloušťka kožních řas (skinfold thickness)
Shh	morfogenní protein Sonic (Sonic hedgehog protein)
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi organismu (systemic inflammatory response syndrome)
SLOS	Smithův-Lemliho-Oppitzův syndrom

SM	sfingomyelin
SR-B1	<i>scavengerový</i> receptor třídy B typ 1 (scavenger receptor class B type 1)
SRE	sterolový regulační element (sterol responsive element)
SREBP	rodina vazebných proteinů sterolového regulačního elementu (SRE binding proteins)
SSD	doména citlivá na steroly (sterol sensing domain)
StAR	steroidogenní akutní regulační protein
TAG	triacylglyceroly
TC	celkový cholesterol (total cholesterol)
TFA	<i>trans</i> -isomery mastných kyselin (<i>trans</i> -isomers of fatty acids)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
TLC-FID	chromatografie na tenké vrstvě s plamenoionizační detekcí
T-MAS	testikulární meiosu aktivující sterol
VHDL	lipoproteinové částice s velmi vysokou hustotou (very high density lipoproteins)
VLDL	lipoproteinové částice s velmi nízkou hustotou (very low density lipoprotein)
VLDL-C	cholesterol obsažený v částicích VLDL

Příloha

Publikace autora

1. Suljkovicová H., Viguerie N., Kunešová M., Millet L., Avizou S., Hejnová J., Hainer V., Barbe P., **Vecka M.**, Tvrzická E., Langin D., Štich V.: Vliv výživy na metabolismus tukové tkáně. *Česk fyziol* **2001**, 50, 57
2. **Vecka M.**, Kunešová M., Staňková B., Žák A., Viguerie N., Hejnová J., Hainer V., Barbe P., Langin D., Štich V., Tvrzická E.: Změny složení mastných kyselin v séru a tukové tkáni u obézních žen po velmi přísné nízkenergetické dietě. *Klin bioch metabol* **2001**, 9, 119
3. Tvrzická E., **Vecka M.**, Staňková B., Žák A.: Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection - Quantitative aspects. *Anal Chim Acta* **2002**, 465, 337
4. Zeman M., Žák A., **Vecka M.**, Tvrzická E., Romaniv S., Konárková M.: Treatment of hypertriglyceridemia with fenofibrate, fatty acid composition of plasma and LDL, and their relations to parameters of lipoperoxidation of LDL. *Ann NY Acad Sci* **2002**, 967, 336
5. Žák A., Tvrzická E., **Vecka M.**, Romaniv S., Zeman M., Konárková M.: Effects of selected anthropometric parameters on plasma lipoproteins, fatty acid composition, and lipoperoxidation. *Ann NY Acad Sci* **2002**, 967, 522
6. **Vecka M.**, Tvrzická E., Staňková B., Žák A.: Effect of column and software on gas chromatographic determination of fatty acids. *J Chromatogr B* **2002**, 770, 91
7. Žák A., **Vecka M.**, Tvrzická E., Hrubý M., Novák F., Papežová H., Konárková M., Lubanda H., Veselá L., Staňková B.: Klinická a biochemická charakteristika mentální anorexie. *Čas Lék čes* **2003**, 142, 280
8. Dlouhý P., Tvrzická E., Staňková B., **Vecka M.**, Žák A., Straka Z., Fanta J., Pacht J., Kubišová D., Rambousková J., Bílková D., Anděl M.: Higher content of 18:1 trans fatty acids in subcutaneous fat of persons with coronarographically documented atherosclerosis of the coronary arteries. *Ann Nutr Metab* **2003**, 47, 302
9. Zeman M., Žák A., **Vecka M.**, Romaniv S.: Long-term hypolipidemic treatment of mixed hyperlipidemia with a combination of statins and fibrates. *Čas Lék Čes* **2003**, 142, 500
10. Růžičková J., Rossmeisl M., Pražák T., Flachs P., Šponarová J., **Vecka M.**, Tvrzická E., Bryhn M., Kopecký J.: Omega-3 PUFA of Marine Origin Limit Diet-Induced Obesity in Mice by Reducing Cellularity of Adipose Tissue. *Lipids* **2004**, 39, 1177
11. **Vecka M.**, Tvrzická E., Staňková B., Novák F., Nováková O., Žák A.: Hypolipidemic drugs can change the composition of rat brain lipids. *Tohoku J Exp Med* **2004**, 204, 299
12. Zeman M., Žák A., **Vecka M.**, Tvrzická E.: Insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases. *Čas Lék Čes* **2005**, 144 Suppl 1, 19-20, 22
13. Žák A., Tvrzická E., Zeman M., **Vecka M.**: Pathophysiology of and clinical significance of polyunsaturated fatty acids n-3 family. *Čas Lék Čes* **2005**, 144 Suppl 1, 6
14. Žák A., **Vecka M.**, Tvrzická E., Hrubý M., Novák F., Papežová H., Lubanda H., Veselá B., Staňková B.: Composition of plasma fatty acids and non-cholesterol sterols in anorexia nervosa. *Phys Res* **2005**, 54, 443
15. **Vecka M.**, Žák A., Tvrzická E.: Sterols, Especially Cholesterol and Phytosterols, in Human Metabolism. Kapitola 6.54.3.7. in *Physiology and Maintenance, from Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, [<http://www.eolss.net>] – kapitola v online encyklopedii
16. Zeman M., Žák A., **Vecka M.**, Tvrzická E., Písaříková A., Staňková B.: N-3 fatty acid supplementation decreases plasma homocysteine in diabetic dyslipidemia treated with statin-fibrate combination. *J Nutr Biochem* **2006**, 17, 379
17. **Vecka M.**, Richterová B., Žák A., Tvrzická E., Šrámková P., Staňková B., Klimčáková E., Štich V.: Změny složení mastných kyselin v séru a tukové tkáni v závislosti na obsahu tuků v

- nízkoenergetické dietě. *Čas Lék Česk* **2006**, 145, 464
18. Tvrzická E., Staňková B., **Vecka M.**, Žák A.: Potravinové doplňky s rybími oleji – složení mastných kyselin. *Čes.-slov. Pediatr.* **2006**, 61, 513
 19. Tvrzická E., Žák A., **Vecka M.**, Staňková B.: Fatty Acids in Human Metabolism. Kapitola 6.54.3.5 in *Physiology and Maintenance, from Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, [<http://www.eolss.net>] – kapitola v online encyklopedii
 20. Žák A., Zeman M., **Vecka M.**, Tvrzická E.: Kyselina nikotinová – lék neprávem opomíjený. *Čas Lék Česk* **2006**, 145, 825
 21. **Vecka M.**, Žák A., Tvrzická E.: Rostlinné steroly jako funkční potraviny. *Čas Lék Česk* **2007**, 146, v tisku