

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Alterace křivek glycidových parametrů dle úrovní LDL
cholesterolu u ne-diabetických pacientů**

Diplomová práce

Bc. Veronika Voltrová

Školitel Ing. Vladimír Kron PhD.

České Budějovice, 2025

Voltrová, V., 2025: Alterace křivek glycidových parametrů dle úrovně LDL cholesterolu u ne-diabetických pacientů. [Alterations of curves of glycid metabolism parameters according to levels of LDL cholesterol in non- diabetics. Mgr. Thesis, in Czech]-53 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This master thesis aims to analyze alterations of glucose-related parameters according to different levels of LDL cholesterol in non-diabetics. All parameters are evaluated during the oral glucose tolerance test. The individuals diagnosed with diabetes mellitus, statins treatment or using supplements that affected the metabolism of fat or glycidides were excluded. The next goal of the thesis is to summarize the available information about the phenomenon of lipotoxic effect and predict its development in metabolically healthy individuals.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Dále prohlašuji, že jsem nástroj nebo službu generativní umělé inteligence Microsoft Designer použila v souladu s akademickou etikou za účelem generování obrázků.

V Českých Budějovicích, 16.4.2025.

Veronika Voltrová

.....

Poděkování

Děkuji svému školiteli, panu Ing. Vladimíru Kronovi PhD., za trpělivé vedení a cenné rady během psaní této práce. Dále děkuji svému snoubenci Timovi Anderlemu za nehynoucí podporu nejen ve studijních záležitostech. Děkuji své rodině za maximální podporu a vstřícnost během celého studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Obecné informace o lipoproteinech	2
1.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti lipoproteinů.....	2
1.1.2 LDL	3
1.1.3 HDL, VLDL, IDL	5
1.2 LDL cholesterol jako marker zdravotního rizika.....	6
2. Metody stanovení lipoproteinů, referenční rozmezí.....	7
2.1 Přímé metody stanovení LDL	8
2.2 Friedewaldova formule.....	9
3. Lipotoxický efekt.....	10
3.1 Role neesterifikovaných mastných kyselin v lipotoxicitě.....	10
3.2 Mechanismy lipotoxického efektu	11
3.3 LDL cholesterol ve vztahu k metabolismu glycidových parametrů	15
3.3.1 LDL cholesterol ve vztahu ke glukóze	15
3.3.2 LDL cholesterol ve vztahu k inzulinu	16
3.3.3 LDL cholesterol ve vztahu k C-peptidu.....	19
4. Cíle práce	20
5. Materiály a metody	21
5.1 Výběr analyzovaného souboru	21
5.2 Orální glukózo-toleranční test, inzulinosenzitivita.....	21
5.3 Zpracování biologického materiálu.....	22
5.4 Rozdělení a výběr souboru dle zadaných kritérií.....	22
5.5 Statistická analýza dat	23
6. Výsledky	25
6.1 Popisné statistiky analyzovaných skupin	25
6.2. Porovnání glycidových parametrů dle úrovně LDL	28
6.2.1 Změny koncentrací C-peptidu v závislosti na koncentraci LDL	29
6.2.2 Změny koncentrace inzulinu v závislosti na úrovni LDL.....	31
6.2.3. Změny koncentrace glukózy dle úrovně LDL	33
6.2.4 Změny indexu HOMA IR v závislosti na koncentraci LDL	35
6.3 Porovnání průběhu středních hodnot během oGTT dle skupin LDL	35
Závěr	41

Zkratky:	42
Literatura	44

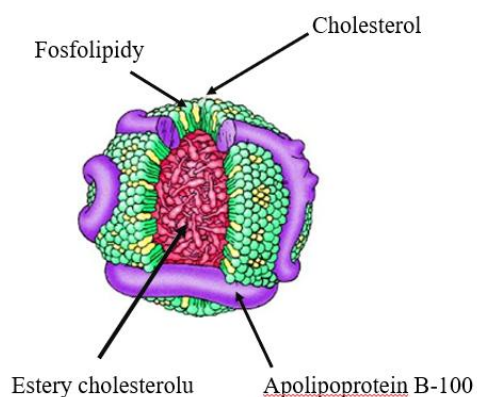
1. Úvod

Dle predikcí International Diabetes Federation vzroste počet jedinců s diabetem do roku 2045 až o 46 %. Celkový počet diabetiků je pak odhadován na 783 milionů lidí. 90 % diabetiků tvoří osoby s diabetem mellitus 2. typu, který je do značné míry ovlivnitelný životním stylem, nejen z hlediska preventability, ale důležitý je i vliv životosprávy na komplikace asociované s touto diagnózou. (International Diabetes Federation, 2025).

Tato diplomová práce se proto zabývá analýzou parametrů asociovaných s glukózou za fyziologických podmínek, zároveň hodnotí jejich dynamiku po glukózové zátěži. Všechny parametry jsou hodnoceny ve vztahu k hodnotám LDL cholesterolu a jeho referenčnímu rozmezí. To umožňuje zaměřit se na vliv zejména rozdílných hodnot LDL na metabolismus sacharidů. Vztah mezi lipidovým a sacharidovým metabolismem je předmětem vědeckého bádání, nicméně dosud nebyl zcela objasněn. Díky hodnocení unikátní databáze, která čítá data více než 1800 osob, může tato diplomová práce poskytnout vhled do změn sacharidového metabolismu probíhajících u zdravých jedinců, v závislosti na různých hodnotách LDL cholesterolu. Pozornost je také věnována lipotoxickému efektu, který je považován za komplexní stav zahrnující několik molekulárních mechanismů, nicméně z dlouhodobého hlediska může lipotoxicita negativně ovlivňovat funkci beta buněk a samotný lipidový metabolismus.

1.1 Obecné informace o lipoproteinech

Jedná se o makromolekulární komplexy tvořené kombinací lipidů a specifických proteinů, které slouží k transportu lipidů v plazmě. Lipoproteinům lze přiřadit charakter micel, kdy strukturně je pak možné rozlišit jádro a obal. V lipoproteinovém jádře se nachází kombinace esterů cholesterolu, triacylglycerolů a volného cholesterolu v různém stechiometrickém poměru, mezi sloučeninami se uplatňují hydrofobní interakce. Lipoproteinový obal obsahuje specifické apolipoproteiny amfipatického charakteru. Většina apolipoproteinů má pravděpodobně strukturu šroubovice, k jejíž stabilizaci dochází v lipidovém prostředí. Nepolární část šroubovice je orientována směrem k jádru a uplatňuje se zde interakce nepolární části řetězce mastných kyselin a aminokyselin apolipoproteinů obsahujících aromatické jádro. Naopak polární část zahrnující amidy, hydroxylové nebo karboxylové skupiny, je orientována směrem ven, stejně jako „hlava“ lipoproteinů. Zevní část je dále doplněna volným cholesterolem. Zjednodušený model LDL znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1. Model LDL cholesterolu. (upraveno, Cell BioLabs, Inc. Dostupné online. staženo 21.10. 2024)

1.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti lipoproteinů

K základním fyzikálním a chemickým vlastnostem lipoproteinů, které umožňují jejich dělení, patří:

- **denzita**
- **elektroforetická pohyblivost**
- **chemické složení**

Přičemž platí, že čím větší denzita částic, tím menší je jejich velikost.

Dle **denzity** lipoproteiny lze kategorizovat následovně:

High-density lipoproteins, lipoproteiny vysoké hustoty (**HDL**). Jejich zdroj závisí na konkrétní podskupině. Primární zdroj představují játra a střevo, strukturálně vznikají katabolismem chylomikronů a VLDL.

Intermediate-density lipoproteins, lipoproteiny střední hustoty (**IDL**). Zdrojem je katabolismus VLDL v plazmě. Hlavní obsaženou třídu představují v těchto částicích estery cholesterolu.

Low density lipoproteins, lipoproteiny nízké hustoty (**LDL**). Vznikají katabolismem IDL.

Very low-density lipoproteins, lipoproteiny velmi nízké hustoty (**VLDL**). Primárně se tyto částice nacházejí v játrech. (Zima, 2013)

Specifickou kategorií jsou pak **chylomikrony**, částice bohaté na triacylglyceroly, které se objevují postprandiálně. Klíčový je obsah apolipoproteinu B₄₈ (ApoB₄₈). Právě tato komponenta umožňuje chylomikronům vstup do lymfatického systému, který se tak stává nezbytnou součástí metabolismu těchto částic. (Masopust, 1998)

Elektroforetická pohyblivost závisí na velikosti a složení částice, dále také na náboji povrchových apolipoproteinů a jeho změnách. Anomálie v elektroforetické pohyblivosti mohou vypovídat například o geneticky podmíněných patologických stavech (např. nález β -VLDL, putujících stejně rychle jako LDL, u familiární hypercholesterolemie typu III).

Z hlediska **chemického složení** může být většina tříd lipoproteinů klasifikována do různých podskupin. Díky funkci cholesterol ester transfer proteinu (CETP) lze nalézt ve složení mastných kyselin v jednotlivých sloučeninách největší podobnost mezi HDL a LDL částicemi. (Zima, 2013)

Níže jsou stručně představeny jednotlivé třídy lipoproteinů, s důrazem na LDL cholesterol.

1.1.2 LDL

Třídu lipoproteinů o nízké hustotě lze rozdělit na základě hustoty a velikosti do několika frakcí, jejichž přehled uvádí tabulka číslo I.

Tabulka číslo I. Přehled subfrakcí LDL. (podle Zima, 2013).

Subfrakce LDL	Velikost (nm)	Hustota (g/ml)
I	27,5-26	1,025-1,034
II	26-25,5	1,034-1,044
III	25,5-24,2	1,038-1,050
IV	24,2-21,8	1,048-1,065

Třídy III a IV se souhrnně označují jako small dense LDL (sd LDL). Jejich zvýšenou koncentraci lze nalézt například u diabetické dyslipidémie, klíčové je pak jejich stanovení u specifických syndromů souvisejících s poruchami metabolismu cholesterolu. (Zima, 2013).

Tvorba sd LDL vychází ze sekrece VLDL₁ játry za situace, kdy je zvýšena hladina triacylglycerolů nad 1,5 mmol/l (Griffin et al. 1994). Naopak, při nižších hladinách dochází k syntéze středně velkých LDL částic (subfrakce II), které představují pravděpodobně nejefektivnější subfrakci pro vazbu na LDL receptory. (Lund-Katz et al. 1998)

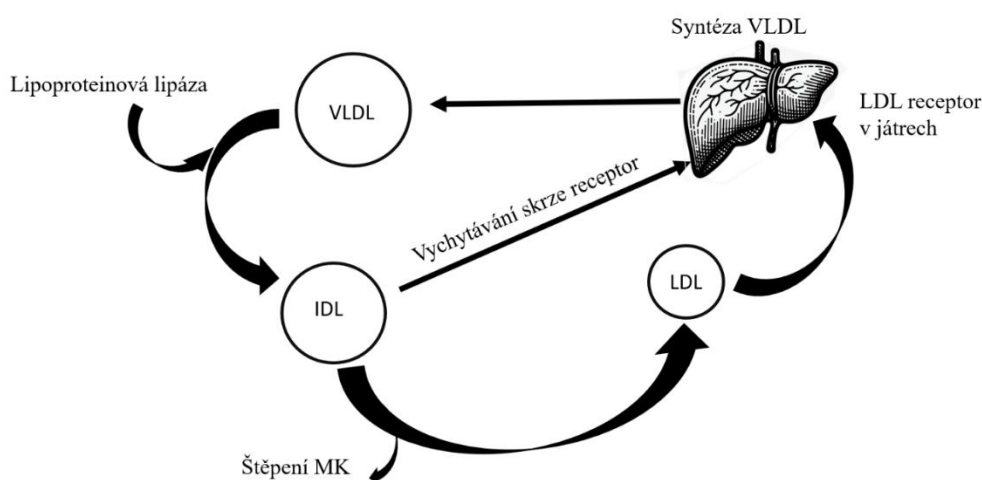
Právě receptory LDL cholesterolu představují rozhodující faktor pro naměřené hodnoty LDL cholesterolu v periferní krvi. Vychytávání LDL cholesterolu svými receptory ovlivňuje hodnoty LDL více než syntéza LDL částic z VLDL (Brown et Goldstein 1986). Za zmínku stojí také farmakologické cílení na LDL receptory v terapii patologického lipidového profilu. Zvýšená exprese transportérů LDL cholesterolu, konkrétně ABCA1 a ABCG1, představuje mechanismus adaptace na vysoké intrabuněčné koncentrace LDL cholesterolu ve snaze zachovat buněčnou homeostázu (Guevara-Olaya et al., 2022).

Jediným apolipoproteínem nacházejícím se v LDL částicích je ApoB100. Jedná se o glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 500 tisíc daltonů a obsahujícím 4536 aminokyselin, přičemž vazebná doména pro LDL receptor se nachází mezi rezidui na pozicích 3100-3400 (Morita, 2016). Z hlediska sekundární struktury lze rozlišit pět domén: $\beta\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$, $\alpha 3$, přičemž domény označené řeckým písmenem β jsou klíčovým místem

pro silnou a irreverzibilní vazbu ApoB100 k lipidovému jádru (Blasiolo et al. 2007). Apolipoprotein B má kromě izoformy ApoB100 ještě druhou izoformu, ApoB48, která se vyskytuje v chylomikronech a jejich remnantech, tzn. syntéza ApoB48 probíhá v tenkém střevě, zatímco ApoB100 je syntetizována v játrech. Obě tyto formy jsou nicméně kódovány stejným genem APOB. (Kounatidis et al. 2024)

1.1.3 HDL, VLDL, IDL

Vzhledem k endogennímu původu LDL je nutno zmínit i další třídy lipoproteinů. Syntéza VLDL probíhá v játrech. Částice VLDL obsahují zejména triacylglyceroly přijaté ve stravě. V jejich jádře lze nalézt estery cholesterolu, zatímco obal je tvořen volným cholesterolem, fosfolipidy a apolipoproteinem B-100. VLDL jsou secernovány do plazmy, kde jsou hydrolyticky rozštěpeny lipoproteinovou lipázou. Tento proces vede ke vzniku částic IDL a zároveň jsou uvolněny volné mastné kyseliny. Tyto mohou být využity ihned v závislosti na potřebách tkání. Částice IDL jsou částečně odbourávány v játrech, kde existují receptory specificky vázající pouze apolipoprotein E, na rozdíl od LDL receptorů, schopných vázat jak apolipoprotein B, tak i apolipoprotein E. Zhruba polovina původního množství IDL je využita pro syntézu LDL částic.



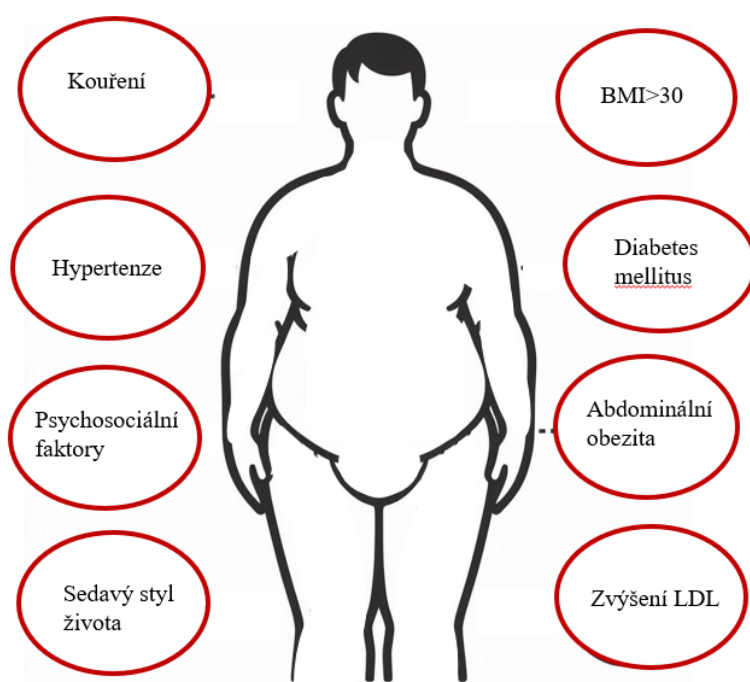
Obrázek 2. Zjednodušené schéma vztahu mezi VLDL, IDL a LDL (vytvořeno s editorem Microsoft Designer. Voltrová, staženo 21.10.2024).

HDL částice hrají klíčovou roli v procesu označovaném jako reverzní transport cholesterolu. Tento termín označuje posloupnost dějů, počínající uvolněním cholesterolu z membrány buňky při jejím zániku a následně vazba cholesterolu na částice HDL v plazmě. V posledních dvou krocích je pak zajištěn transport cholesterolu na HDL částicích do jater a jeho odstranění.

Samotné HDL produkují buňky tenkého střeva. Tyto částice mají diskovitý tvar a označují se jako nascentní. Zároveň mohou vznikat při katabolismu chylomikronů a VLDL. Ve složení dominují z lipidového spektra volný cholesterol a fosfolipidy, z apolipoproteinů převažují apolipoproteiny A (ApoA-II, ApoA-I), (Svačina, 2010).

1.2 LDL cholesterol jako marker zdravotního rizika

Výsledky epidemiologických i intervenčních studií, čítající statisíce účastníků, přinášejí jasné výsledky o vlivu a významu stanovení LDL cholesterolu. Klíčovým důvodem pro pravidelné sledování hodnot LDL cholesterolu v rámci prevence je fakt, že čím dříve je zachycen nález zvýšených hodnot, tím dříve lze snížit negativní vliv LDL cholesterolu na cévní stěnu. (Češka, 2021) LDL cholesterol totiž představuje klíčový parametr, zahrnutý v tabulkách SCORE, sloužící k predikci budoucího rizika kardiovaskulárních příhod. Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění popisuje obrázek 3.



Obrázek 3. Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění (vytvořeno s editorem Microsoft Designer. Voltrová, staženo 21.10.2024).

Zároveň se jedná o cílový ukazatel v managementu dyslipidemií, rozhodující o farmakologické léčbě na bázi statinů. Důležitý je také význam tohoto markeru v diagnostice familiární hypercholesterolemie. Vzhledem k užívání různých přístupů ke stanovení LDL cholesterolu, jak bude popsáno níže, je při dlouhodobém sledování hodnot LDL cholesterolu

nezbytné provádět stanovení tohoto parametru a jeho případných změn u daného pacienta vždy ve stejném zařízení. (Soška, 2022)

LDL cholesterol ovlivňuje komponenty zapojené do regulačního renin-angiotenzin systému (RAS). Nadměrná aktivita tohoto systému vede ke zvýšené expresi angiotenzin II receptoru typu 1 (AT1R). Exprese tohoto receptoru roste zároveň se zvyšující se koncentrací LDL cholesterolu. Tento stav může představovat počátek kaskády vedoucí v kombinaci se zánětem k endoteliální dysfunkci, oxidativnímu stresu a angiogenezi. Existuje však kompenzační mechanismus, zajištěn karboxypeptidázou ACE2, která hydrolyzuje angiotenzin II. Produkce ACE2 koresponduje s poklesem koncentrace proteinu HNF1 α , která je závislá na rostoucí koncentraci LDL cholesterolu. Primárním regulátorem ACE2 je transmembránová serinová proteáza 2, jejíž hladina zůstává i po stimulaci LDL cholesterolem konstantní. (Guevara-Olaya et al., 2022)

2. Metody stanovení lipoproteinů, referenční rozmezí

Metody stanovení lipoproteinů zahrnují metody výzkumné a referenční, jako příklad lze uvést ultracentrifugaci. Ultracentrifugace představuje referenční metodu pro izolaci jednotlivých tříd lipoproteinů, přičemž takto získané třídy lze dále analyzovat a získat kompletní přehled o chemickém složení jak bílkovinné, tak lipidové složky. Metodu lze doplnit o vyšetření fenotypu velikosti LDL částic. Ultracentrifugaci lze rozdělit na sekvenční v izopyktnickém prostředí, nebo jednokrokovou v hustotním gradientu. Další metoda, spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR spektroskopie), je cenná pro zjištění koncentrací subfrakcí jednotlivých podtříd lipoproteinů.

Restriction fragment length polymorfism (RFLP) a isoelektrická fokusace (IEF), metody pro typizaci variant ApoE se řadí ke speciálním laboratorním metodám, jejichž účelem je identifikace jedinců se specifickým genotypem pro ApoE. Zároveň se pomocí těchto metod provádí diagnostika hyperlipoproteinémie typu III. dle Fredricksona (dále jen HLP III). Kapilární plynová chromatografie (CGLC) představuje další metodu dostupnou pro zjištění koncentrace mastných kyselin v lipidových třídách. Dále je možné posoudit zastoupení sterolů, uplatňující se v diagnostice vzácných patologií. Molekulárně-genetické metody se uplatňují ve vyhledávání mutací v genu pro LDL receptor, kterých je známo více než 900. (Zima, 2013)

Tabulka číslo II. uvádí biologickou variabilitu (intra a interindividuální) u vybraných lipoproteinů.

Tabulka II. Biologická variabilita vybraných parametrů. (Westgard database, 2024).

Parametr (vyš. materiál)	CVi	CVg
Cholesterol (sérum)	5,95	15,3
LDL cholesterol (sérum)	7,8	20,4
LDL cholesterol, small dense (sérum)	9,1	20,0

CVi=intraindividuální biologická variabilita, CVg=interindividuální biologická variabilita.

2.1 Přímé metody stanovení LDL

Jedná se o postupy, jejichž výsledkem je vznik barevného produktu, který je spektrofotometricky změřen. Principem těchto metod je změnit relativní reaktivitu cholesterolu v lipoproteinových třídách (Zima, 2013). Což je zajištěno použitím detergentů, jak je popsáno níže.

Existuje několik analytických metod stanovení LDL cholesterolu. **Imunoseparační metody** využívají latexové kuličky s protilátkami proti apolipoproteinům AI a E. Tím je zajištěna izolace LDL od chylomikronů, VLDL a HDL. **Homogenní analytické metody** zahrnují několik postupů. První postup používá polymerní detergent uvolňující cholesterol ze všech jiných částic než LDL. Následuje reakce s cholesterolesterázou, cholesteroxidázou, peroxidázou a 4 aminoantipyrinem. Vzniká bezbarvý produkt. Dalším krokem je uvolnění cholesterolu z LDL za pomoci detergentu. Barevného produktu je dosaženo reakcí LDL cholesterolu s prvním činidlem a dvojsodnou solí N,N-bis(4-sulfobutyl)-m-toluidinu.

Druhý postup je **založen na zablokování LDL cholesterolu emulgátorem** tak, že nereagují s dalšími činidly. Další lipoproteiny reagují s cholesterolesterázou, cholesteroxidázou, katalázou a N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilinem. Produkty těchto reakcí jsou bezbarvé. Další činidlo uvolňuje cholesterol z LDL, obsažený azid sodný inhibuje katalázu. LDL cholesterol následně reaguje s prvním činidlem, peroxidázou a 4-aminoantipyrinem již obsaženým ve druhém činidle. Vzniká barevný produkt. Třetí postup začíná **stabilizací VLDL a chylomikronů**. Stabilizace je zajištěna cyklodextrin sulfátem, dextran sulfátem a komplexy obsahujícími hořečnaté ionty. Dále je přítomna peroxidáza a sodná sůl N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilinu. Následně jsou vytvořeny

micely HDL, chylomikrony a VLDL, čímž dochází k inhibici jejich reakcí. LDL cholesterol reaguje s prvním činidlem a cholesterolesterázou, cholesteroxidázou a 4-aminoantipyrinem za vzniku barevného produktu. Čtvrtý postup využívá **enzymového komplexu stabilizujícího LDL cholesterol**. Nejprve reaguje cholesterol ostatních lipoproteinů za vzniku bezbarvých produktů. Následně je detergentem uvolněn cholesterol z LDL, obsažený azid sodný inhibuje katalázu. Barevný produkt vzniká jakožto výsledek reakcí LDL s cholesterolesterázou, cholesteroxidázou, katalázou a N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilinem, peroxidázou a 4-aminoantipyrinem.

Heterogenní metody zahrnují několik přístupů. Problém představuje oddělení částic obsahujících ApoB. Ten je obsažen jak v LDL, tak VLDL částicích. Heterogenní metody často nevykazují dostatečně specifické oddělení těchto částic. Dále dochází k precipitaci LDL a stanovení VLDL a HDL, ke stanovení LDL dochází nepřímou. Nezanedbatelným problémem je také reakce činidel, která nebývá rovnoměrná a vede k zahrnutí nežádoucích tříd lipoproteinů do výsledku. (FONS, staženo 25.10.2024)

Tabulka III. Shrnutí variačních koeficientů, celkové chyby a vychýlení jednotlivých metod. (FONS, 2024)

Metoda	Reprodukovatelnost v sérii CV	Reprodukovatelnost mezi sériemi CV	Výtěžnost	
Imunoseparační	1,2-3,8 %	2,0-5,1 %	96,4-97,8 %	
Homogenní analytická	Reprodukovatelnost v sérii CV	Celkové CV	Celková chyba	Vychýlení
1. postup	0,6-1,5 %	0,8-1,7 %	3,8 %	-2,6 až 0 %
2. postup	0,5-1,1 %	1,0-1,4 %	5,9 %	-5,0 až -2,1 %
3. postup	0,5-1,5 %	1,3-1,9 %	5,8 %	-3,4 až + 8,9 %
4. postup	0,6-0,9 %	0,6-1,0 %	15,5 %	+ 9,6 až +18, 0 %

CV=variační koeficient

2.2 Friedewaldova formule

Jedná se o stanovení LDL cholesterolu nepřímou, pomocí rovnice ve tvaru:

$$LDL = TC - \frac{TG}{2,2} - HDL$$

kde LDL=low density lipoproteins, TC=total cholesterol, TG=triacylglycerols, HDL=high density lipoproteins).

Ačkoli se jedná o konvenčně užívaný, zavedený způsob stanovení LDL-C, jehož neoddiskutovatelnou výhodou je nízká cena, nelze nezmínit situace, které se stávají poměrně běžnými, ale znemožňují použití této metody:

- Hodnota triacylglycerolů je vyšší než 4,5 mmol/l.
- Hodnoty LDL cholesterolu jsou velmi nízké, po přepočtu na mmol/l pod 1,14 mmol/l.

Ve snaze definovat více odpovídající a přesnější vztah, vznikly v posledních letech dvě nové rovnice pro výpočet hodnot LDL: Martin-Hopkinsova a Sampsonova rovnice. Ačkoli se Friedewaldova rovnice jeví jako nejméně adekvátní u osob s velmi nízkými hodnotami LDL, ani zbývající dvě výše jmenované rovnice nepřinášejí zcela přesvědčivé výsledky pro použití v klinické praxi (Benido et al. 2023)

3. Lipotoxický efekt

Obecně lze lipotoxicitu definovat jako poškození buněčných funkcí, například translace proteinů nebo činnost mitochondrií s následnou buněčnou smrtí v důsledku zvýšení koncentrace volných mastných kyselin (FFA). Kromě několika mechanismů popsanych níže přispívá k lipotoxickému efektu také nepoměr mezi příjmem a využitím FFA (Römer et al., 2021). I přes studium molekulárních mechanismů lipotoxického efektu se zdá, že jde o komplexní problém, zahrnující mnoho biochemických procesů a metabolitů.

3.1 Role neesterifikovaných mastných kyselin v lipotoxicitě

Neesterifikované mastné kyseliny (NEFA), označované také jako volné mastné kyseliny (FFA) jsou definovány jako karboxylové kyseliny, přičemž různá délka řetězce a počet nenasyčených vazeb ovlivňuje toxický potenciál (Lv et al., 2014).

Volné mastné kyseliny představují elementární komponent pro vznik lipotoxického efektu. Níže jsou představeny zásadní vlastnosti umožňující hlubší porozumění níže popsaným mechanismům lipotoxicity.

Obecně toxický potenciál mastných kyselin roste s délkou uhlíkového řetězce a klesá s přítomností dvojných vazeb (Plötz et al., 2019). Nasycené NEFA, například palmitát, slouží jako prekurzor pro syntézu ceramidů. Palmitoyl-CoA potom slouží jako aktivovaná forma aktivující sfingosin kinázu 2, enzym zásadní pro syntézu ceramidů. Výzkumy ukazují, že mononenasyčené mastné kyseliny, například kyselina olejová, není využitelná coby substrát pro syntézu ceramidů a cytotoxický efekt na buňky je nižší (Eitel et al., 2002;

Maedler et al., 2001). Příjem FFA, které mohou narušit funkci mitochondrií, je zajištěn následovně: FFA jsou aktivovány acyl-CoA, který je do mitochondrie transportován pomocí enzymu karnitin acyltransferáza I, který je klíčový pro lipidový metabolismus a zajišťující přístup vnější mitochondriální membránou. Vstup přes vnitřní membránu je zprostředkován carnitin-acylcarnitin translokázou, následně dochází ke štěpení na carnitin a acyl-CoA v mitochondriální matrix. Acyl-coA je v procesu β -oxidace degradován a vznikají molekuly acetyl-CoA a redukčních ekvivalentů NADH a FADH₂ (Talley and Mohiuddin, 2020). Acetyl-CoA je následně využit v cyklu trikarboxylových kyselin k získání dalších redukčních ekvivalentů. Právě poruchy v tomto cyklu, zejména pak defekty jednotlivých enzymů, jsou jedním z důsledků lipotoxického efektu. Nefunguje-li TCA cyklus správně, může docházet k oslabení sekrece inzulínu po stimulaci glukózou (Römer et al., 2021).

Vliv NEFA na apoptózu je ovlivněn dvěma proteiny přímo figurujiícími v procesu apoptózy: prvním z nich je exprese kaspáz (proapoptotických proteáz), druhým pak redukce exprese proteinu Bcl2, který působí naopak ve prospěch přežití buňky (Lupi et al., 2002).

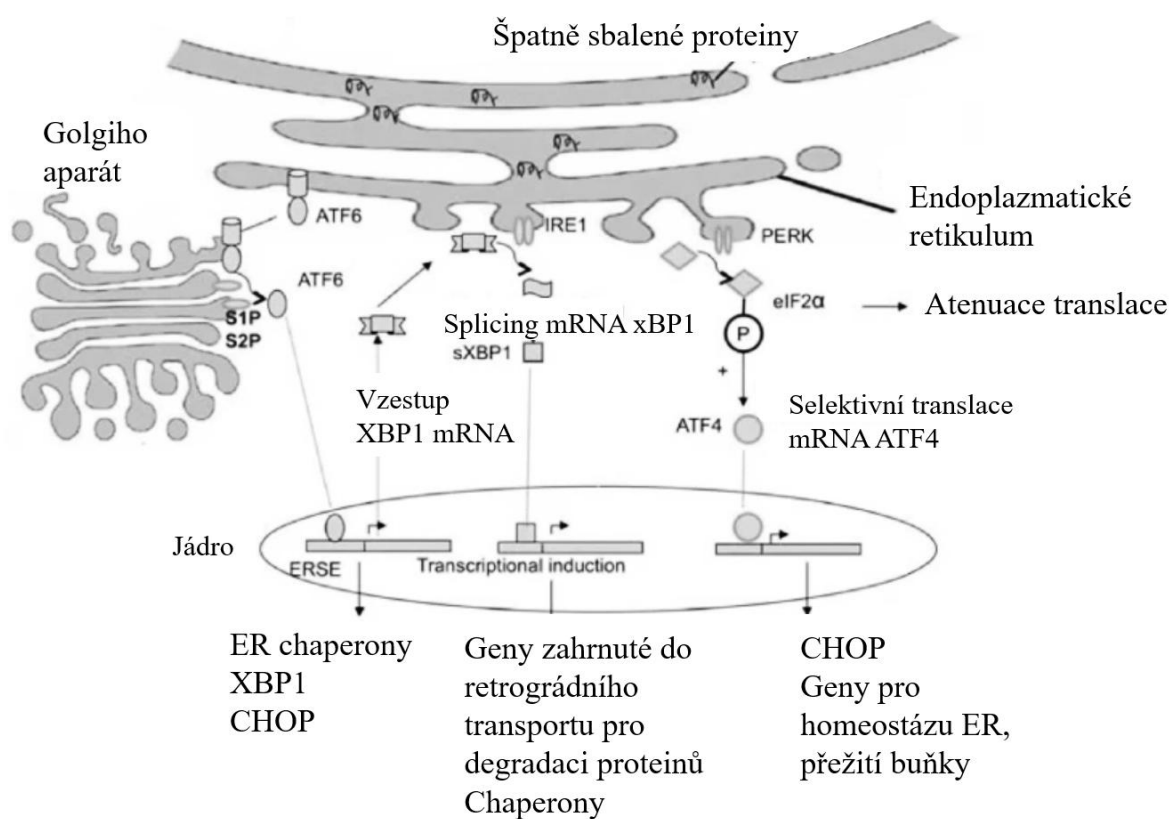
Úloha NEFA a lipotoxický efekt se staly předmětem zájmu jak *in vitro*, tak *in vivo* studií. *In vitro* studie prezentují konzistentní výsledky. Zvýšená koncentrace NEFA má jasně negativní dopad na beta buňky pankreatu a vede k jejich apoptóze, a to bez ohledu na přítomnost hyperglykémie (u které je předpoklad glukotoxického efektu). *In vivo* studie tak jasné závěry nepřinášejí. Krátkodobé zvýšení NEFA v plasmě zvýšilo nebo nemělo efekt na sekreci inzulínu. Infuze NEFA trvající 48-72 hodin způsobila jak zlepšení, tak zhoršení funkce beta buněk, případně nebyl pozorován žádný efekt. Klíčový je fakt, že toto platí u zdravých dobrovolníků (van Raalte et al., 2010). U obézních jedinců, pacientů s diagnózou diabetes mellitus typu 2 a výskytem diabetes mellitus typu 2 v rodině se situace diametrálně liší. Prolongovaná infuze NEFA narušila glukózou stimulovanou sekreci inzulínu (Boden et al., 1999; Kashyap et al., 2003). Vysvětlení spočívá pravděpodobně v procesu lipoadaptace, kdy sekrece inzulínu nereaguje na přítomnost glukózy (Poitout et al., 2008). Tyto procesy se podílí na vzniku dysfunkce beta buněk pankreatu a následně inzulínové rezistence, která představuje rizikový faktor vzniku diabetu mellitus 2. typu. (Römer et al., 2021).

3.2 Mechanismy lipotoxického efektu

K blíže studovaným mechanismům lipotoxického efektu patří:

Stres endoplazmatického retikula: označuje stav, kdy dochází k nepoměru mezi syntézou nových proteinů a požadavkům buňky na jejich vznik. V endoplazmatickém retikulu se tak

nachází přemíra špatně sbalených proteinů. Nachází-li se v endoplazmatickém retikulu příliš defektních proteinů, je aktivována buněčná odpověď na nesbalené nebo špatně sbalené proteiny (unfolded protein response, dále UPR). In vitro experimenty využívající buněčné linie β -buněk pankreatu poukázaly na aktivaci signálních kaskád IRE-1, PERK a transkripčního faktoru (ATF6). Cílem je snížení syntézy nových proteinů a degradace proteinů špatně sbalených. Pokud tento krok není dostačující, UPR aktivuje dráhy vedoucí k apoptóze buňky. Klíčové molekuly pro zahájení apoptózy představují protein CHOP a JNK kináza. (vanRaalte, 2010)



Obrázek 4. Mechanismy UPR. (upraveno podle Li et al., 2011, staženo 30.10.2024)

Vliv LDL cholesterolu na aktivaci UPR byl popsán v roce 2022. V beta buňkách pankreatu byla vlivem LDL cholesterolu detekována translokace transkripčních faktorů XBP1 a CHOP, následkem čehož je aktivována kaskáda IRE-1 a PERK. Dále byla LDL cholesterolem indukována exprese cyklooxygenázy 2 (COX-2) a prozánětlivé Il-6 a NF- κ B. Přítomnost zánětlivé odpovědi však nesnížila životaschopnost buněk. Dlouhotrvající, nevýrazný zánět v kombinaci s obezitou je však podle některých autorů potenciální příčinou zdravotních komplikací (Guevara-Olaya et al., 2022).

Detailní mechanismus, jakým chronické zvýšení neesterifikovaných mastných kyselin aktivuje stres endoplazmatického retikula, není znám. Byla vyslovena teorie, že zvýšení NEFA snižuje zásoby vápenatých iontů, čímž dochází ke snížení kapacity ER pro správné sbalení proteinů (Cunha et al., 2008).

Do jaké míry se stres endoplazmatického retikula, jakožto následek samotného zvýšení NEFA uplatňuje u lidí, není jasné. Elektronová mikroskopie ukázala u beta buněk pankreatu pacientů s diabetem mellitus typu 2 jak zvýšení ukazatelů stresu endoplazmatického retikula, tak zapojení apoptotických drah, na rozdíl od nediabetických kontrol. Problém pro interpretaci představuje výskyt hyperglykemických stavů u diabetiků. Samotná hyperglykémie může vést ke stresu endoplazmatického retikula (Bachar et al., 2009).

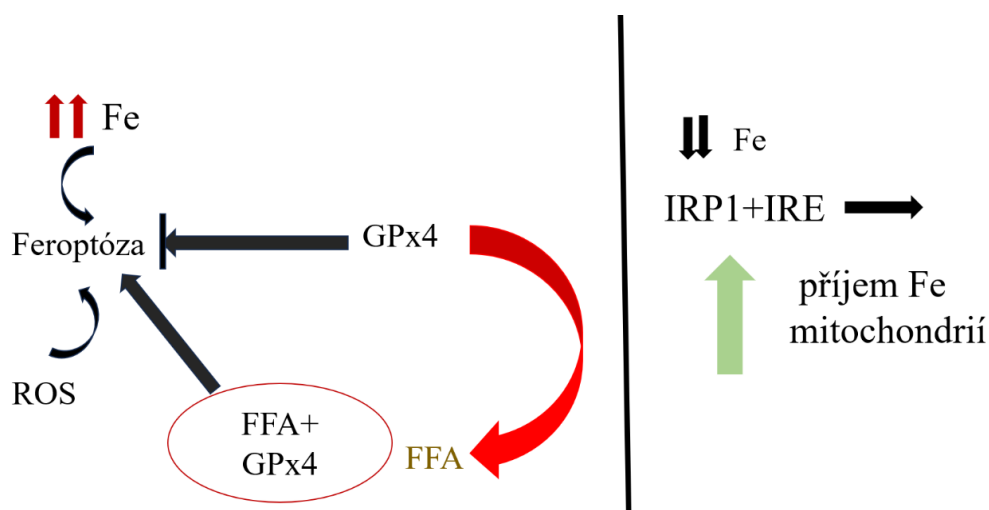
Oxidační stres a mitochondriální dysfunkce: oxidační stres vzniká při dlouhodobé nerovnováze mezi produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a antioxidanty. Mitochondrie jsou nejen zdrojem ROS, ale také představují hlavní cíl těchto molekul. Může docházet k poškození mitochondriální DNA a defektům membránových proteinů nezbytných ke správnému fungování mitochondrie. Dysfunkční mitochondrie nejsou schopny vytvářet dostatečné množství ATP. (vanRaalte, 2010)

Role oxidačního stresu a mitochondriální dysfunkce při uplatnění lipotoxického efektu je patrná zejména u beta buněk pankreatu. Tyto buňky disponují pouze omezeným množstvím antioxidantních enzymů, proto je role oxidačního stresu a mitochondriální dysfunkce klíčovým aspektem zasahujícím do regulace procesu glukózy stimulované sekrece inzulínu.

Syntéza ceramidů. Ceramidy zasahují do mnoha fází buněčného cyklu, od proliferace přes růst buňky až po apoptózu (Maedler et al., 2001). Mohou narušit jak inzulínovou senzitivitu, fosforylaci inzulín receptor substrátu (dále jen IRS-1), tak samotnou expresi inzulínu (Römer et al., 2021). Důsledkem je i mitochondriální dysfunkce: narušení acetylace proteinů klíčových pro metabolismus mitochondrie. Může dojít k inhibici komplexu III elektron-transportního řetězce a snížení potenciálu na mitochondriální membráně (Wehinger et al., 2015). Zároveň mohou ceramidy zvyšovat oxidační stres buňky, a to přes ovlivnění indukibilní syntázy oxidu dusnatého (Lee et al., 2013) a NADPH oxidázy 2 produkující superoxid (Li et al., 2017).

Ovlivnění FeS klastrů. FeS klastry vznikají dráhou označovanou jako iron-sulfur cluster assembly machinery (ISC), (Stehling et al., 2014). Tato dráha obsahuje více než 18 proteinů, zodpovědných za tvorbu, přenos a inkorporaci FeS klastrů do apolipoproteinů (Braymer and

Lill, 2017). FeS klastry se uplatňují v mnoha procesech: klíčový je jejich obsah v komplexech I, II a III dýchacího řetězce, dále existují enzymy obsahující FeS klastry, sloužící jako senzory molekul kyslíku. FeS klastry se také uplatňují při genové expresi a v metabolismu lipidů (Römer et al., 2021). Vzhledem k významu mitochondriální dysfunkce jakožto jednoho z mechanismů lipotoxického efektu je na místě zmínit význam enzymu akonitáza. Tento enzym má různou funkci v závislosti na umístění: mitochondriální akonitáza je součástí TCA cyklu, zatímco cytosolická akonitáza se podílí na homeostáze železa. Z anglického označení iron regulatory protein 1 pochází její zkratka IRP1 (Rouault, 2006). V případě deficitu železa, IRP1 váže IRE (iron regulatory element) a tím umožňuje mitochondrii zvýšený příjem Fe. Tento mechanismus je evolučně konzervován a lze jej nalézt napříč živočišnou i rostlinnou říší (Camaschella et al., 2007). Dojde-li k opačné situaci, a to nadbytečnému příjmu Fe, dochází v kombinaci kyslíkovými radikály ke spuštění neapoptotických drah vedoucích ke smrti buňky a známých jako ferroptóza (Dixon et al., 2012). Tomuto stavu může zabránit enzym glutathion peroxidáza 4 (GPx 4), působící v glutathion-dependentních reakcích. Problémem je vyčerpání glutathionu mastnými kyselinami, které přispívají k přeměně glutathionu na glutathion disulfid, čímž dochází ke ztrátě protektivních vlastností glutathionu (Xu et al., 2017). Obrázek níže shrnuje dráhy související s obsahem železa v buňce a volnými mastnými kyselinami.



Obrázek 5. Zjednodušené schéma drah souvisejících s metabolismem Fe a mastnými kyselinami. (Vltrová, 2024).

Ve vztahu k apolipoproteinům je klíčová přítomnost proteinu glutaredoxin 5, který je součástí ISC dráhy a zajišťuje transport a inkorporaci FeS klastrů do apolipoproteinů. Experimentálně bylo zjištěno, že volné mastné kyseliny vyvolávají deficit tohoto proteinu

(Petry et al., 2018). Následkem tohoto stavu dochází k poruchám metabolismu mitochondrií a to v důsledku narušení funkce TCA cyklu a komplexů I až III dýchacího řetězce. Ferroptóza může představovat počáteční stimul pro zhoršení funkce beta buněk pankreatu projevujícím se sníženou sekrecí inzulínu. Jsou dokumentovány případy mutace glutaredoxinu 5, které se projevíly rozvojem onemocnění diabetes mellitus, ferroptózou a špatnou funkcí enzymů (Camaschella et al., 2007).

3.3 LDL cholesterol ve vztahu k metabolismu glycidových parametrů

Cílem jednotlivých podkapitol je přiblížit parametry glycidového metabolismu: glukózu, inzulín a C-peptid. Jejich hodnoty byly měřeny v průběhu orálního glukózo-tolerančního testu (oGTT). Následující podkapitola uvádí studie využívající podobnou metodiku, jako tato diplomová práce. Cílem je poskytnout vhled do praktické části diplomové práce, která se věnuje analýze výše uvedených parametrů ve vztahu k hodnotám LDL cholesterolu.

Dále je na začátek vhodné uvést, že slinivka břišní komunikuje s různými tkáněmi prostřednictvím extracelulárních vezikulů. Extracelulární vezikuly představují heterogenní skupinu, do které lze zařadit exozómy nebo mikrovezikuly. Společnou charakteristikou vezikulů je lipidová dvouvrstva na povrchu. Dojde-li ke změně tkáňového mikroprostředí, je stimulována sekrece a zároveň se mění obsah těchto vezikulů, které mohou být produkovány různými buňkami. Důsledkem může docházet ke zvýšení krevního tlaku, inzulínové rezistenci a manifestaci metabolického syndromu. Je známý vliv extracelulárních vezikulů produkovaných hepatocyty na beta buňky pankreatu: ovlivňují jejich proliferaci, dále komunikace mezi pankreatem a hepatocyty představuje významný krok v regulaci systémového metabolismu (Guevara-Olaya et al., 2022).

3.3.1 LDL cholesterol ve vztahu ke glukóze

Z hlediska syntézy LDL cholesterolu dochází k propojení s glukózovým metabolismem přes acetyl koenzym A (acetyl-CoA), přičemž tato látka představuje substrát pro endogenní syntézu cholesterolu (Xiao et al., 2022). Enzym štěpící citrát na acetyl-CoA a oxaloacetát, ATP-citrát-(pro-S)-lyáza (ACL), byl identifikován jakožto nový terapeutický cíl pro snížení hladin cholesterolu (Pinkosky et al., 2016). Látka schopna inhibice exprese ACL je kyselina bempedová, zajišťující signifikantní pokles hladin LDL cholesterolu (Laufs et al., 2019).

Další mechanismus, jak lze snížit hladiny LDL cholesterolu, související s koncentrací glukózy v krvi, představuje zvýšení aktivity enzymu proteinové kinázy aktivované AMP (AMPK) pomocí metforminu. Metformin snižuje hladinu glukózy v krvi, čímž zamezuje

inhibici exprese AMPK, způsobenou právě stavu zvýšené glykémie. (Xu et al., 2015) Hyperglykémie snižuje poměr mezi AMP/ATP a ADP/ATP a následně pokles aktivity AMPK (Salt et al., 1998).

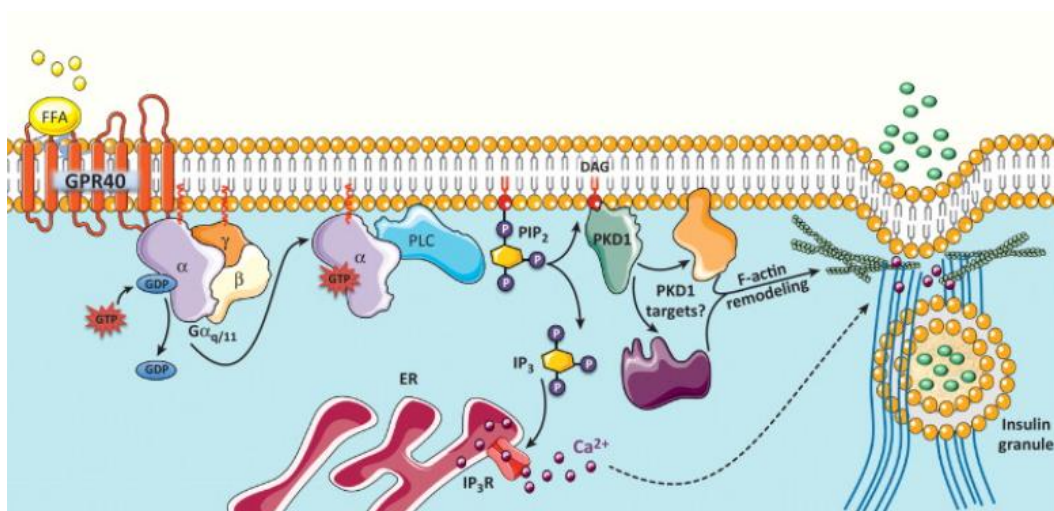
Na zdravých dobrovolnících, konkrétně studentech do věku 30 let, byly zjišťovány změny hodnot glykémie a inzulinu během oGTT testu a dále jejich lipidový profil. Pro účely této studie byly vyřazeny všechny osoby s poruchou glukózové tolerance. Účastníci s normální glukózovou tolerancí byly rozděleny do čtyř skupin podle času testu, ve kterém se glykémie vrátila do hodnot naměřených na začátku testu. Bylo zjištěno, že u jedinců ve skupině IV byli signifikantně vyšší naměřené koncentrace glukózy a inzulinu v porovnání se zbývajících skupinami. Taktéž byly v této skupině významně vyšší hodnoty LDL cholesterolu. Hodnoty parametru AUC se zvyšovaly od druhé do čtvrté skupiny a byly tak parametrem s největšími pozorovatelnými změnami, což je ale pouze důsledek rozdělení jedinců, které bylo uvedeno výše. (Ishigaki et al., 2019)

3.3.2 LDL cholesterol ve vztahu k inzulinu

Sekrece inzulinu, jakožto reakce na zvýšení koncentrace glukózy v plazmě, představuje klíčový mechanismus pro udržení homeostázy glycidového metabolismu (Dannecker et al., 2021). Pokud dojde k vazbě inzulinu na receptor, je fosforylován IRS-1. Následně dochází k fosforylaci Akt kinázy, která je součástí phosphatidyl inositol 3 kinázy (PI3K). Výsledkem je translokace transportéru GLUT 4 na membránu buňky, čímž je umožněn prostup glukózy do vnitřního prostředí. (Brault et al., 2014).

Elementárním krokem v sekreci inzulinu je zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Průchod Ca^{2+} iontů membránou je kontrolován otevřením napětím-řízenými kanály. Souvislost mezi volnými mastnými kyselinami a Ca^{2+} kanály je následující: volné mastné kyseliny jsou do buňky přenášeny pomocí transportéru CD 36 (Clarke et al., 2004), který je hojně exprimován právě beta buňkami pankreatu (Ly et al., 2017). Důvodem exprese tohoto transportéru je pravděpodobně zajištění potřebné dávky energie nezbytné pro metabolismus buňky. CD 36 preferenčně váže mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (Pepino et al., 2014). Navázáním mastné kyseliny je aktivována zánětlivá odpověď, čímž dochází ke zvýšení oxidačního stresu buňky, která je tak vnímavější k poškození radikály (Okamura, et al., 2009). Dalším možným způsobem, jak procházejí mastné kyseliny membránou, je vazba na receptor spřažený s G-proteinem 40 (GPR40) (Kristinsson et al., 2017). Tento receptor aktivuje fosfolipázu C, ta degraduje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na inositol trifosfát a diacylglycerol, což vede k uvolnění vápenatých iontů (Chen et al., 2020). Doplnění zásob

vápenatých iontů je zprostředkováno aktivací ER Ca^{2+} ATPázy (SERCA). Aktivita této ATPázy může být narušena zvýšenou koncentrací FFA, v důsledku nedoplnění vápenatých iontů je pak znemožněna stimulovaná sekrece inzulinu. Dále dochází k dysregulaci TCA cyklu (následkem ovlivnění enzymů vyžadujících Ca^{2+}), transportu NADH a elektron-transportního řetězce (Ly et al., 2020).



Obrázek 6. Sekrece inzulinu po vstupu volných mastných kyselin do buňky. (Mancini and Poitout, 2013)

Přímý vliv LDL cholesterolu na zásoby Ca^{2+} objasnila detailní studie z roku 2022, dokládající závislost exocytózy inzulinu na koncentraci LDL cholesterolu, přičemž koncentrace vápenatých iontů zůstala zachována za zvýšení exprese plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA1/4) a SERCA 2, dále také NCX-1, exchangeru podílejícího se na výměně Ca^{2+} a Na^{+} iontů. Jedná se o adaptivní mechanismus, zajišťující udržení inzulinové homeostázy (Guevara-Olaya et al., 2022). Nicméně v rozporu uvádějí autoři studii, ve které došlo působením kyseliny palmitové a lipopolysacharidů k proteolytické degradaci PMCA1/4 a tím k ovlivnění životaschopnosti B-buněk pankreatu (Acosta-Montaño et al., 2019)

Není známo, zda existuje přímý vztah mezi sníženou syntézou cholesterolu a porušenou funkcí vápníkových kanálů. Byla vyslovena teorie, že dochází ke špatnému uspořádání lipidových raftů na membráně buňky nebo změnám konformace některých podjednotek kanálů, což ovlivňuje jejich funkci (Xia et al., 2008). Experimentálně bylo zjištěno, že endocytóza LDL cholesterolu B-buňkami zvyšuje mRNA inzulinu a jeho sekreci. Konkrétně došlo ke zvýšení exprese transkripčního faktoru PDX-1, což v kombinaci s lipotoxicitou může vést ke stavu známému jako hyperinzulinismus (Guevara-Olaya et al., 2022). Tato

patologie může být příčinou nealkoholického ztučnění jater, které u obézních pacientů vede k manifestaci klinických příznaků (Kouvari et al., 2022).

Koncentrace inzulinu v plazmě, jak na lačno, tak po stimulaci sekrece, vykazuje širokou inter-individuální variabilitu. Tu nelze zcela vysvětlit inzulinovou senzitivitou, koncentrací glukózy v plazmě nebo stupněm obezity (Wagenknecht et al., 2003; Ferrannini et al., 2007). Závěry studií zkoumajících vliv lipoproteinů na inzulinovou sekreci jsou značně nekonzistentní. Mezi možná vysvětlení lze zařadit nejasné rozlišení mezi NEFA a lipoproteiny, interference s farmakologickou léčbou, dále také chybějící měření inzulinové sekrece a senzitivity-kdy nejspolehlivější, ale technicky náročnou metodou je euglykemický clamp (Natali et al., 2017). I proto se výše citovaná studie zaměřila na hodnocení parametrů v rámci oGTT a spojením s jednotlivými třídami lipoproteinů u zdravých jedinců. U 980 účastníků studie bylo měření určitých parametrů zopakováno po 3,5 letech. Studie však nenašla žádný vztah mezi fyziologickými hodnotami LDL cholesterolu a inzulinovou sekrecí. Pouze výrazně patologické hodnoty LDL cholesterolu ovlivňující inzulinovou sekreci.

Zdá se, že určitá koncentrace LDL cholesterolu je potřebná k zachování fyziologických funkcí inzulinu a jeho signalizace. To naznačují studie, ve kterých došlo následkem snížení hodnot LDL cholesterolu k poruše v regulaci glukózového metabolismu (Chrysant, 2017, Waters et al., 2014). Dalším mechanismem, který přímo souvisí s hladinou LDL cholesterolu, je inhibiční efekt na enzym 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA), zásadní element v syntéze LDL cholesterolu. Je důležité zmínit, že efekty statinů se ve vztahu k inzulinu velmi liší, zároveň existují rizikové faktory zvyšující pravděpodobnost rozvoje diabetu při léčbě statiny. (Chrysant, 2017)

Za zmínku stojí studie provedená na nediabetické populaci v Japonsku, zabývající se souvislostí mezi hodnotami inzulinu, inzulinorezistencí a parametry ovlivňujícími rychlost průtoku krve. Bylo zjištěno, že hodnoty inzulinu na lačno pozitivně korelují s hodnotami fibrinogenu, hematokritu a hemoglobinu (Yoshida et al., 2016). Význam snížení rychlosti toku krve ve vztahu k inzulinu spočívá v možném rozvoji inzulinorezistence v důsledku snížení dávky glukózy dodané do kosterních svalů (Barazzoni et al., 2014). Dojde-li ke snížení průtoku krve v důsledku vazokonstrikce cév vedoucích k beta buňkám pankreatu, může to způsobit jejich dysfunkci. To ukázala studie využívající RIP-FRK transgenní myši. Samotná FRK tyrosin kináza slouží k transdukcii cytotoxického signálu beta buněk v reakci

na cytokiny, nebo streptozocin. Důsledkem je zvýšená proliferace beta buněk a nabytí jejich hmoty. U samců transgenních myší se věku čtyř měsíců rozvinula mírná glukózová intolerance. Zároveň byla snížena sekrece inzulinu in vivo po stimulaci glukózou. Po extrakci samotných ostrůvků pankreatu se sekrece inzulinu nelišila od zdravých kontrol, nicméně u transgenních myší byl průtok krve přepočten na objem ostrůvků nižší. Zároveň kapiláry transgenních myší vykazovaly nižší průsvit, zatímco váha pankreatu ani tělesná hmotnost nedosahovaly signifikantních rozdílů. Závěrem studie tedy je, že dlouhodobá exprese FRK kinázy může vést k abnormalitám v anatomii cév a snížit průtok krve slinivkou, což vede k poruchám v sekreci inzulinu. (Annerén et al., 2007)

3.3.3 LDL cholesterol ve vztahu k C-peptidu

Význam C-peptidu, coby diagnostického parametru, spočívá v rozdílné eliminační kinetice ve srovnání s inzulinem. C-peptid není vychytáván játry, nýbrž je odbouráván v ledvinách. Ve své studii poukázali na pozitivní souvislost mezi indexy využívajícími C-peptid jakožto marker pro sekreci a clearance inzulinu a LDL cholesterolem. Naopak, indexy využívající měřené hodnoty inzulinu vykazovaly závislost negativní (Dannecker et al., 2021). Prioritně vznikly studie využívající hodnocení C-peptidu jakožto markeru u diabetických pacientů. Publikací zabývajících se hodnocením C-peptidu a dalších parametrů pro nediabetickou populaci lze nalézt významně méně. Nicméně byl prokázán vztah mezi rostoucími koncentracemi LDL cholesterolu a C-peptidu (Kron et al., 2021). Studie publikována v roce 2016, hodnotící významně menší množství dat, zabývajících se vztahem C-peptidu k lipidovému profilu zdravých jedinců, došla k závěru, že existuje korelace mezi C-peptidem, věkem a LDL cholesterolem, ovšem pouze u mužů. U žen tato korelace pozorována nebyla (Kulkarni et Patil, 2016).

4. Cíle práce

Diplomová práce si klade tyto cíle:

1. Sumarizovat informace na téma vlivu lipoproteinů, zejména LDL, na glycidové parametry a lipotoxický efekt.
2. Pomocí vhodně zvolených statistických metod a postupů vyhodnotit dynamiku glycidových parametrů po glukózové zátěži-oGTT dle úrovně LDL cholesterolu.
3. Popsat a vyhodnotit změny glycidových parametrů v závislosti na hodnotách LDL cholesterolu dle referenčního rozmezí.

5. Materiály a metody

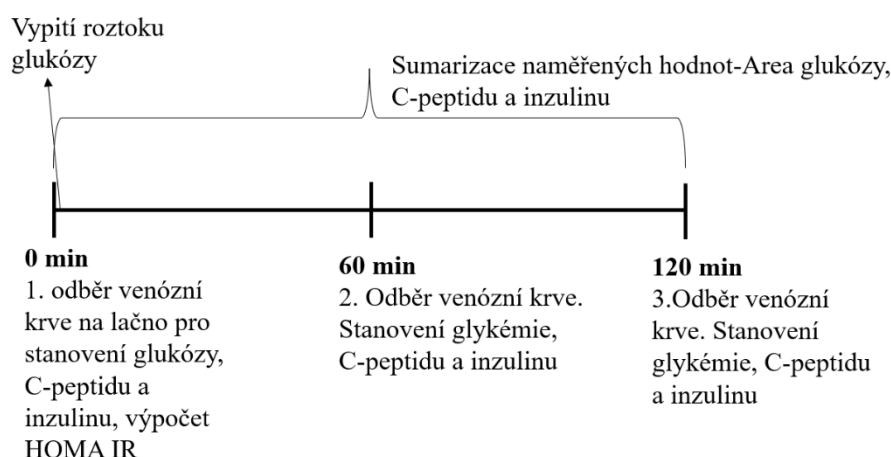
5.1 Výběr analyzovaného souboru

Diplomová práce hodnotí klinická data pacientů, kteří byli klienty ambulance prof. MUDr. Karla Martiníka DrSc. (Institut zdraví profesora MUDr. Karla Martiníka, DrSc., Bratří Štefanů 410/4, 500 03 Hradec Králové 3) v letech 2009-2022. Nedošlo k preferenci žádné socio-ekonomické skupiny. Pracoviště přijímalo pacienty z celé České republiky. Nezbytnou podmínkou pro zařazení jedince do hodnoceného souboru byl věk v rozmezí 16-75 let. Účastníci zahrnutí do vyhodnocení podepsali písemný informovaný souhlas.

5.2 Orální glukózo-toleranční test, inzulinosenzitivita

První vzorek venózní krve byl odebrán po minimálně 8-hodinovém lačnění, jakožto součást orálního glukózo-toleračního testu (oGTT). Ten byl proveden dle platné metodiky.

Schéma oGTT



Obrázek 7. Schéma průběhu oGTT se zaměřením na analyzované parametry (Vltrová, 2025).

Tabulka číslo IV. uvádí rozmezí pro vyloučení/potvrzení diagnózy diabetu mellitus (DM) na základě hodnot glukózy (Glu) naměřených ve 120. minutách testu.

Tabulka číslo IV. Interpretace oGTT testu (ÚKBD FN HK, 2024).

Interpretace	Vyloučen diabetes mellitus	Porušená glukózová tolerance	Diagnóza diabetu mellitus
Hodnota	Glukóza <7,8 mmol/l	Glukóza $\geq 7,8$ mmol/l až <11,1 mmol/l	Glukóza $\geq 11,1$ mmol/l

Hodnoty glykémie a inzulinu získané prvním odběrem krve byly použity k vyhodnocení Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA IR). Tento index slouží k vyhodnocení inzulinorezistence a rizika vzniku diabetu. Je vypočítán na základě rovnice:

$$\text{HOMA IR} = \frac{\text{glukóza} \times \text{inzulin}}{22,5}$$

kde glukóza je dosazena v jednotkách mmol/l, inzulin v mIU/l. Vyhodnocení indexu HOMA IR je vždy vázáno na cut-off hodnotu pro hodnocenou populaci. Ta byla pro Českou republiku stanovena na 3,63 (Horáková et al., 2019).

5.3 Zpracování biologického materiálu

Vzorky krve byly zpracovány pracovištěm Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové (www.fnhk.cz/ukbd), přičemž glukóza byla hodnocena enzymatickou metodou, C-peptid a inzulin byly měřeny ze vzorku krevní plazmy, pro stanovení HDL a LDL cholesterolu byly použity homogenní metody na automatických analyzátoch společností Roche Diagnostics a Abbott laboratories. Parametr Area pro C-peptid, inzulin a glukózu byl získán součtem naměřených hodnot glycidových parametrů za celý oGTT test. Parametr je významný zejména pro inzulin, který je také označován jako total sum of insulin (TSI), spočívá ve schopnosti lépe predikovat riziko prediabetu v porovnání s indexem HOMA IR. Cut-off hodnota TSI byla stanovena na 535 mikroU/ml. Tato studie však zahrnovala dospívající jedince s nadváhou, obezitou a morbidní obezitou (La Valle et al., 2023)

5.4 Rozdělení a výběr souboru dle zadaných kritérií

Na základě referenčního rozmezí pro LDL došlo k rozdělení analyzovaného souboru do tří skupin: skupina s nízkými hodnotami LDL (LDL <1,2 mmol/l), skupina spadající do

referenčního rozmezí pro LDL (1,2-3,0 mmol/l) a poslední skupinu tvoří jedinci s LDL>3,0 mmol/l.

Zároveň došlo k vyřazení probandů s diagnózou diabetu mellitus. Kritériem pro vyřazení jedince z hodnoceného souboru byla hodnota glykémie na lačno >7,1 mmol/l a hodnota glykémie vyšší než 11,1 mmol/l ve 120. minutách. Tabulka číslo V. uvádí počet vyřazených jedinců v jednotlivých skupinách na základě překročené hodnoty glukózy ve 120 minutách testu.

Tabulka číslo V. Počet vyřazených jedinců na základě hodnot glukózy ve 120 minutách testu.

Celkem Skupina	1804	Počet jedinců s Glu>11,1 mmol/l ve 120 min	Počet jedinců bez diabetu (n=1771)
LDL<1,2 mmol/l	19	0	19
LDL 1,2-3,0 mmol/l	883	9	874
LDL>3,0 mmol/l	902	24	878

Dále byly vyřazeny osoby s indikovanou léčbou hypercholesterolémie, případně osoby užívající aditiva ovlivňující metabolismus lipoproteinů a sacharidů.

5.5 Statistická analýza dat

Pro prvotní úpravu databáze bylo využito programu MS Excel. Došlo k vyřazení případů s chybějícími či špatně zapsanými údaji. Dále proběhla selekce souboru pro analýzu na základě hodnot glukózy dle metodiky popsané výše. Byly vytvořeny popisné statistiky zahrnující minimální a maximální hodnotu pro každý parametr, dále byly vypočteny průměrné hodnoty a směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty jsou prezentovány se zaokrouhlením na jedno desetinné místo. Došlo k porovnání získaných hodnot s referenčním rozmezím pro každý parametr. Přehled referenčních rozmezí je zpracován v tabulce číslo VI.

Tabulka č. VI. Referenční rozmezí pro analyzované parametry. (Metoda Glukóza, Inzulin, C-peptid. ÚKBD FN HK)

Parametr (jednotka)	Dolní mez referenčního rozmezí	Horní mez referenčního rozmezí
Glukóza (mmol/l)	3,9	5,6

Inzulin (mU/l)	2,5	24,0
C-peptid (pmol/l)	260,0	1730,0
LDL cholesterol (mmol/l)	1,2	3,0

Vlastní statistické vyhodnocení dat pak proběhlo za pomoci softwaru STATISTICA 12 firmy Statsoft. Prvním krokem analýzy bylo ověření normálního rozdělení dat. Pro test distribuce dat byl zvolen Kolmogorov-Smirnov test. Tento test vyvrátil normální rozdělení, proto byl pro zjištění statisticky významných rozdílů zvolen neparametrický Kruskal-Wallisův test. Ten byl proveden pro C-peptid, inzulin a glukózu měřené v 0, 60 a 120 minutách, parametry Area (C-peptid, inzulin, glukóza). Dále byl analyzován index HOMA IR, také pomocí Kruskal-Wallisova testu.

6. Výsledky

6.1 Popisné statistiky analyzovaných skupin

Tabulka č. VII. Popisné statistiky pro LDL<1,2 mmol/l

LDL<1,2 mmol/l			
C-peptid (pmol/l)			
	0 min	60 min	120 min
n	19,0	19,0	19,0
Min	250,0	810,0	1390,0
Průměr±SD	652±319,0	2341,5 ±991,9	3064,9±1099,1
Medián	550,0	2290,0	3230,0
Max	1290,0	4170,0	5910,0
Inzulin (mU/l)			
	0 min	60 min	120 min
Min	2,0	11,2	20,0
Průměr±SD	6,0±4,1	32,7±25,0	62,5±44,6
Medián	5,1	20,0	47,6
Max	17,7	95,6	220,9
Glukóza (mmol/l)			
	0 min	60 min	120 min
Min	4,4	5,9	4,0
Průměr±SD	5,3±0,4	7,9±1,6	5,9±1,1
Medián	5,3	7,6	5,8
Max	5,9	13,3	7,5
AREA			
	C-peptid	Inzulin	Glukóza
Min	2720,0	33,2	14,9
Průměr±SD	6058,4±2224,9	101,2±63,7	19,0±2,2
Medián	6200,0	67,7	19,3
Max	11100,0	285,5	23,1
Ostatní parametry			
	věk (roky)	LDL (mmol/l)	HOMA IR
Min	19,0	0,5	0,5
Průměr±SD	34,3±11,5	1,0±0,2	1,4±1,0
Medián	35,0	1,1	1,2
Max	54,0	1,2	4,2

Tabulka č. VIII. Popisné statistiky pro LDL 1,2-3,0 mmol/l.

LDL 1,2-3,0 mmol/l			
C-peptid (pmol/l)			
	0 min	60 min	120 min
n	874,0	874,0	874,0
Min	100,0	280,0	176,0
Průměr±SD	713,7±359,9	2315,0 ±1043,5	2951,6±1127,4
Medián	650,0	2200,0	2865,0
Max	2470,0	5810,0	6540,0
Inzulin (mU/l)			
	0 min	60 min	120 min
Min	1,0	2,0	3,8
Průměr±SD	8,1±6,6	39,3±33,2	64,0±45,7
Medián	6,2	30,5	52,0
Max	64,3	224,8	302,8
Glukóza (mmol/l)			
	0 min	60 min	120 min
Min	3,5	3,1	2,9
Průměr±SD	5,3±0,6	8,1±1,8	6,2±1,4
Medián	5,3	8,2	6,0
Max	7,0	16,6	11,0
AREA			
	C-peptid	Inzulin	Glukóza
Min	1280,0	8,0	10,9
Průměr±SD	5980,2±2286,1	111,3±76,4	19,6±3,2
Medián	5817,5	89,2	19,5
Max	14350,0	484,6	32,5
Ostatní parametry			
	věk (roky)	LDL (mmol/l)	HOMA IR
Min	16,0	1,2	0,2
Průměr±SD	37,8±10,8	2,4±0,4	2,0 ±1,7
Medián	37,0	2,5	1,5
Max	73,0	3,0	16,3

Tabulka č. IX. Popisné statistiky pro LDL >3,0 mmol/l.

LDL>3,0 mmol/l			
C-peptid (pmol/l)			
	0 min	60 min	120 min
n	878	878	878
Min	100,0	270,0	490,0
Průměr±SD	809,1±405,6	2677,1±1160,9	3231,1±1163,6
Medián	740,0	2620,0	3161,0
Max	3930,0	8954,0	6460,0
Inzulín (mU/l)			
	0 min	60 min	120 min
Min	0,9	1,0	2,5
Průměr±SD	9,0±7,1	50,6±47,9	73,9±53,2
Medián	7,1	38,0	59,4
Max	88,3	509,3	308,4
Glukóza (mmol/l)			
	0 min	60 min	120 min
Min	3,6	3,3	3,2
Průměr±SD	5,4±0,6	8,5±1,7	6,5±1,5
Medián	5,4	8,5	6,4
Max	7,0	15,4	11,0
AREA			
	C-peptid	Inzulín	Glukóza
Min	1240,0	5,4	12,2
Průměr±SD	6717,3±2455,1	133,6±95,8	20,5±3,2
Medián	6540,0	107,0	20,2
Max	14854,0	644,8	32,1
Ostatní parametry			
	věk (roky)	LDL (mmol/l)	HOMA IR
Min	16,0	3,0	0,2
Průměr±SD	43,6±11,1	3,7±0,6	2,2±1,9
Medián	43,0	3,6	1,7
Max	75,0	7,2	27,1

6.2. Porovnání glycidových parametrů dle úrovně LDL

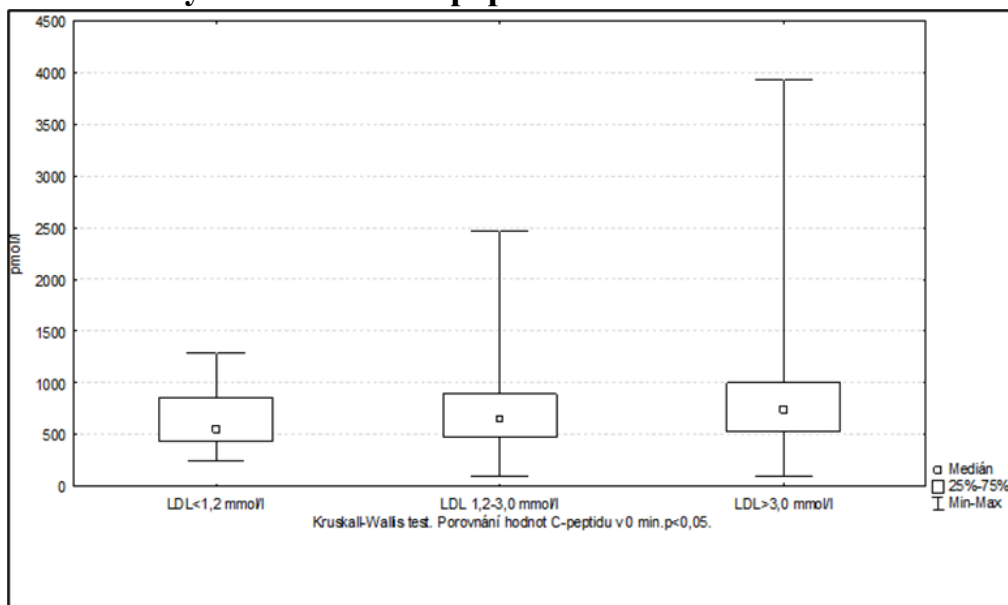
Tabulka č.X. Přehled statisticky významných rozdílů zjištěných Kruskal-Wallisovými testy pro vybrané parametry.

Zjištěné statistické rozdíly testovaných parametrů (Kruskal-Wallisův test)

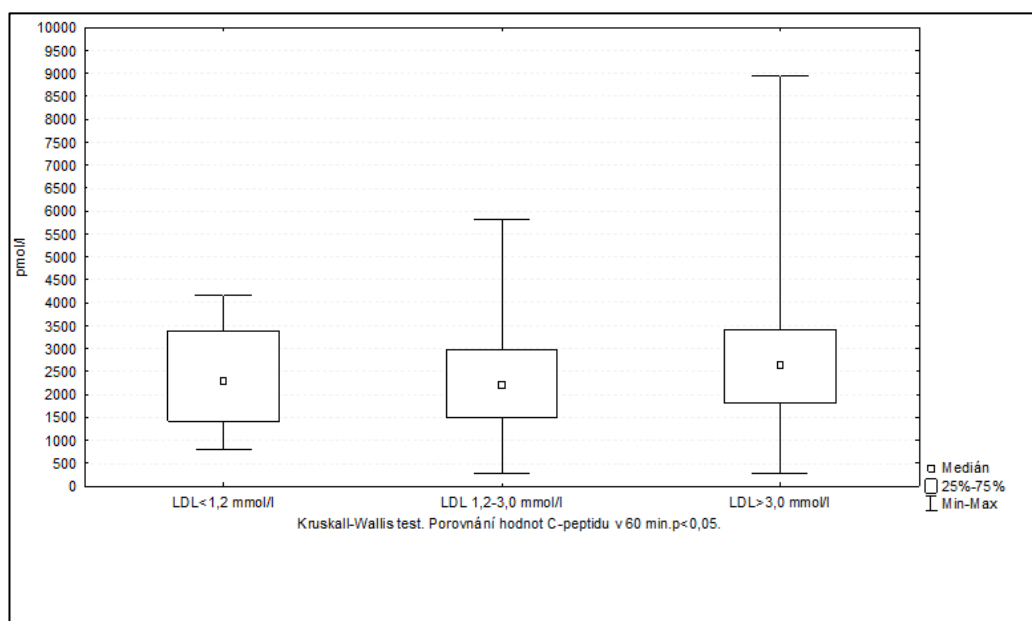
Parametr		Skupina LDL (mmol/l)	
		<1,2	1,2-3,0
C-peptid 0 min	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,23	<0,001***
C-peptid 60 min	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,70	<0,001***
C-peptid 120 min	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	1,00	<0,001***
Area C-peptid	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,80	<0,001***
Inzulin 0 min	1,2-3,0	0,32	—
	>3,0	0,045*	<0,001***
Inzulin 60 min	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,22	<0,001***
Inzulin 120 min	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	1,00	<0,001***
Area inzulin	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,35	<0,001***
Glukóza 0 min	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,77	<0,01**
Glukóza 60 min	1,2-3,0	0,72	—
	>3,0	0,06	<0,001***
Glukóza 120 min	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,25	<0,001***
Area glukóza	1,2-3,0	1,00	—
	>3,0	0,16	<0,001***
HOMA IR	1,2-3,0	0,27	—
	>3,0	0,03*	<0,001***

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

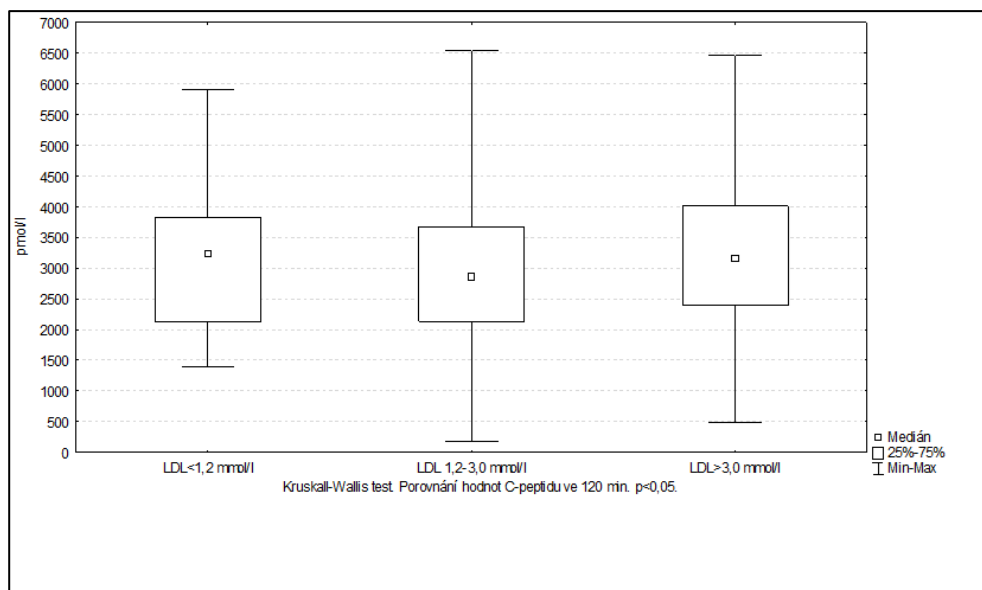
6.2.1 Změny koncentrací C-peptidu v závislosti na koncentraci LDL



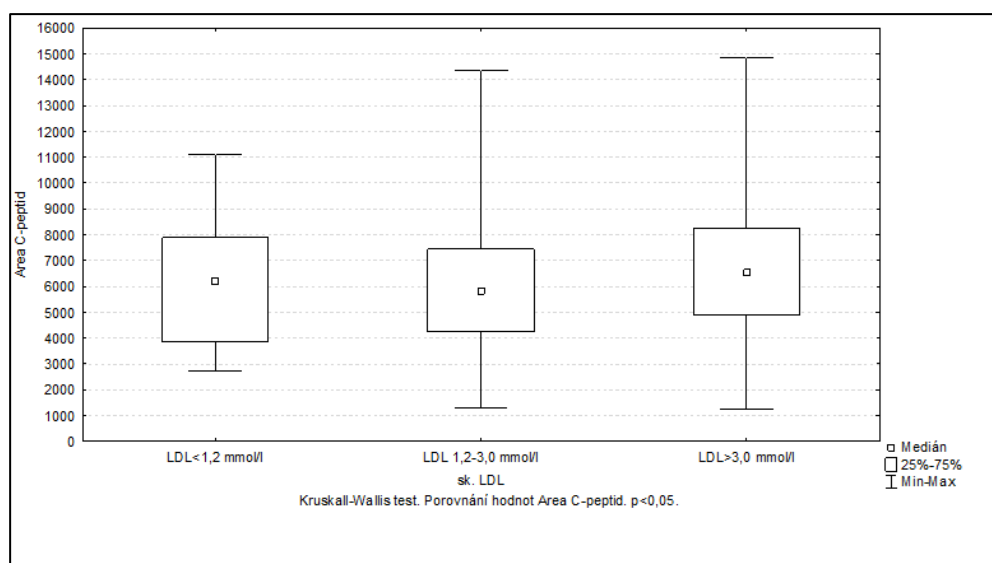
Obrázek č. 8. Změny koncentrací C-peptidu v 0 minutách dle úrovně LDL (Kruskal-Wallisův test). Statisticky významný rozdíl prokázán mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a LDL > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).



Obrázek č. 9. Změny koncentrací C-peptidu v 60 minutách dle úrovně LDL (Kruskal-Wallisův test). Statisticky významný rozdíl je mezi mediány skupin LDL 1,2-3,0 mmol/l a LDL > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).



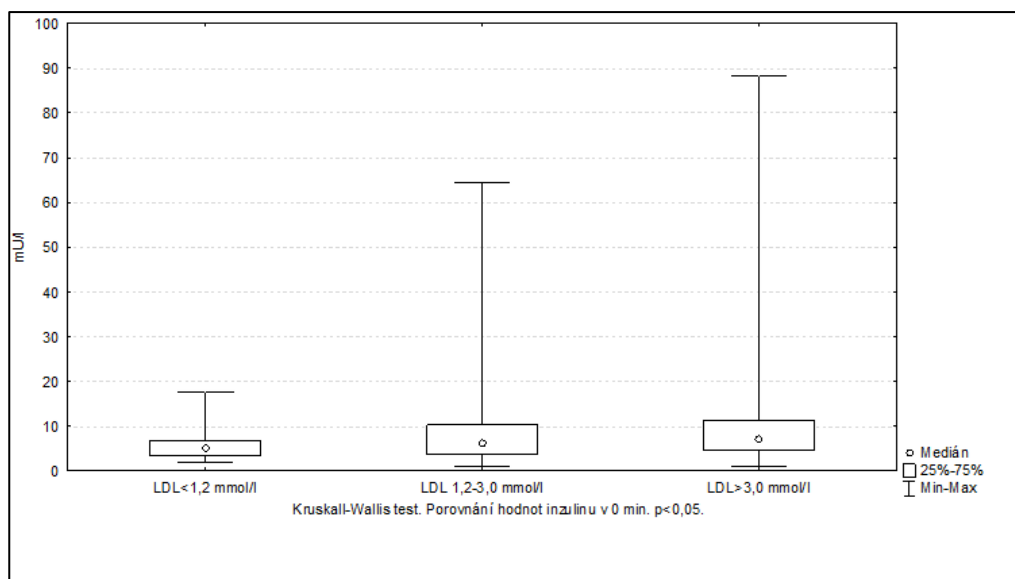
Obrázek č. 10. Změny koncentrací C-peptidu ve 120 minutách dle úrovně LDL (Kruskal-Wallisův test). Statisticky významný rozdíl prokázán mezi LDL 1,2-3,0 mmol/l a LDL > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).



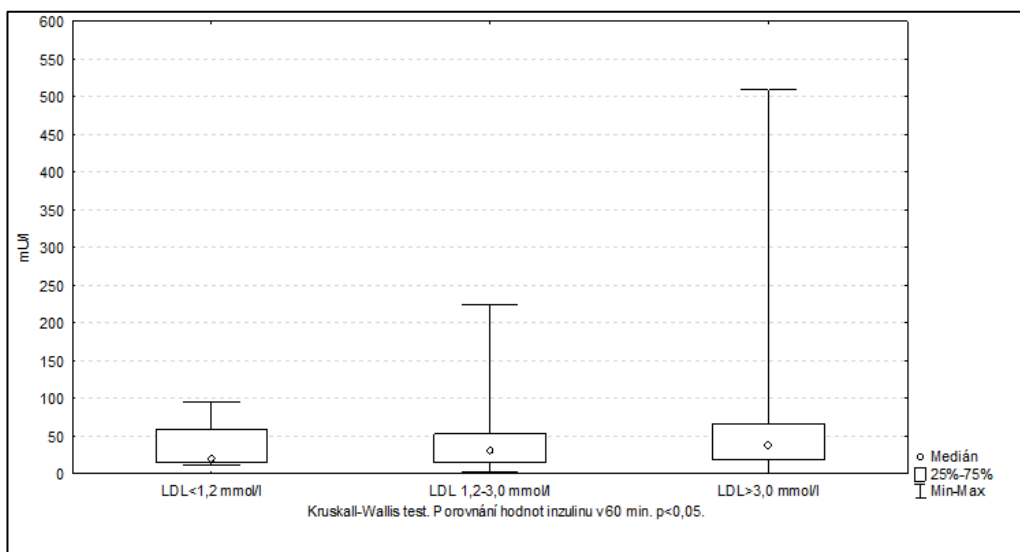
Obrázek č. 11. Změny parametru Area pro C-peptid (Kruskal-Wallisův test). Statisticky významný rozdíl prokázán mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).

U skupiny s LDL > 3,0 mmol/l byly zjištěny signifikantní rozdíly mediánových hodnot ve srovnání se skupinou LDL 1,2-3,0 mmol/l ve všech měřených časech i pro parametr Area C-peptidu. Zajímavé je zjištění velmi podobných hodnot mediánu C-peptidu ve 120 minutách testu u skupin s nízkým a naopak vysokým LDL.

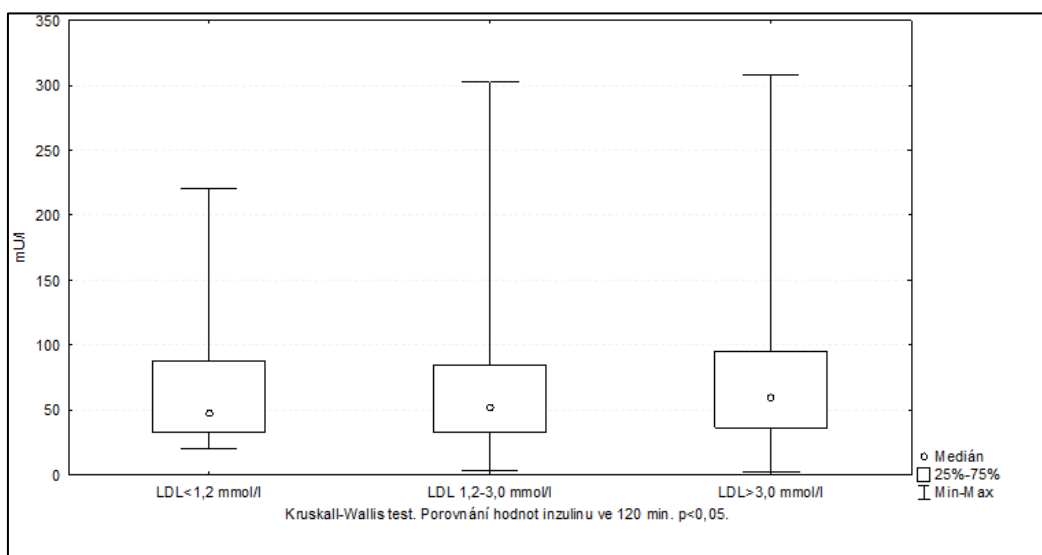
6.2.2 Změny koncentrace inzulinu v závislosti na úrovni LDL



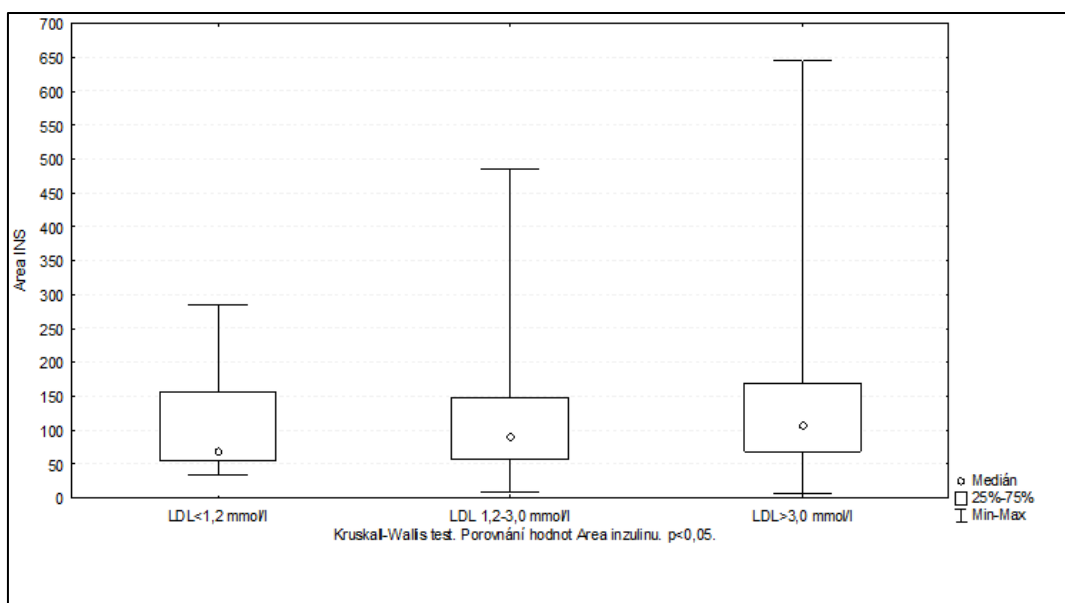
Obrázek č. 12. Změny koncentrací inzulinu v 0 minutách dle úrovně LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) prokázán mezi koncentracemi LDL < 1,2 mmol/l a LDL > 3,0 mmol/l. Zároveň zjištěn signifikantní rozdíl mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a LDL > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).



Obrázek č. 13. Změny koncentrací inzulinu v 60 minutách dle úrovně LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl zde prokázán pouze mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).



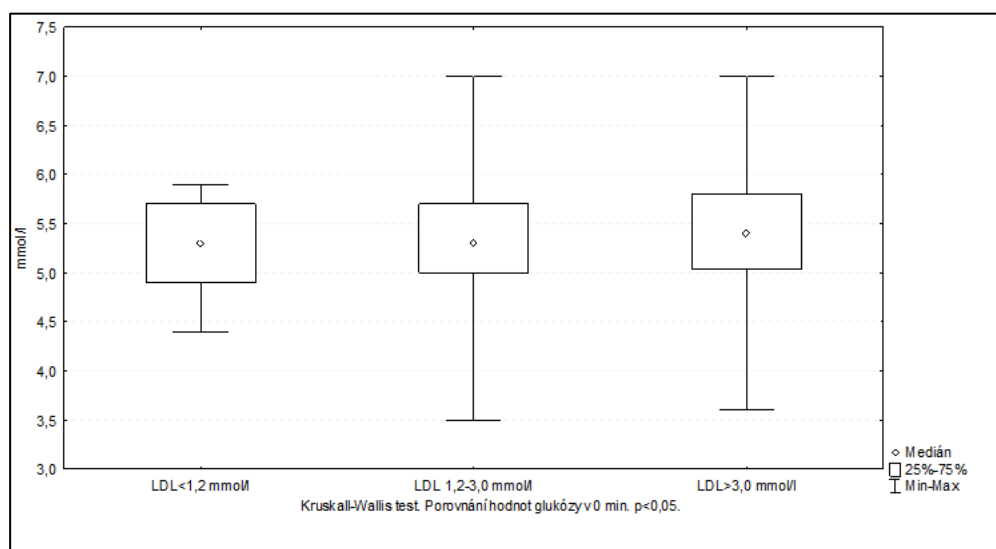
Obrázek č. 14. Změny koncentrací inzulinu ve 120 minutách dle úrovně LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl mediánů skupin LDL 1,2-3,0 mmol/l a LDL > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).



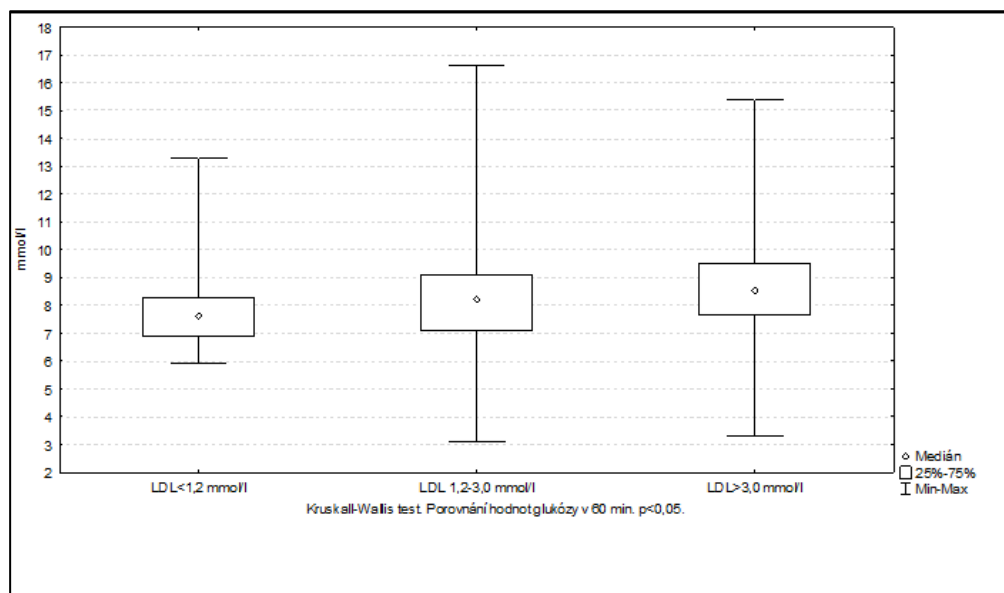
Obrázek č. 15. Změny parametru Area pro inzulin dle úrovně LDL (Kruskal-Wallisův test). Statisticky významný rozdíl prokázán opět mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).

U inzulinu jsou signifikantní rozdíly zjištěny na začátku testu jak ve srovnání se skupinou s velmi nízkým LDL, tak se skupinou referenčního rozmezí pro LDL. V dalším průběhu testu byly taktéž zjištěny velmi signifikantní rozdíly pro medián inzulinu mezi středními a vysokými hodnotami LDL. Skupina s LDL >3,0 mmol/l vykazuje největší rozptyl pozorovaných hodnot, zároveň jsou zde pozorovány nejvyšší naměřené maximální hodnoty ve všech časových bodech zátěžového testu.

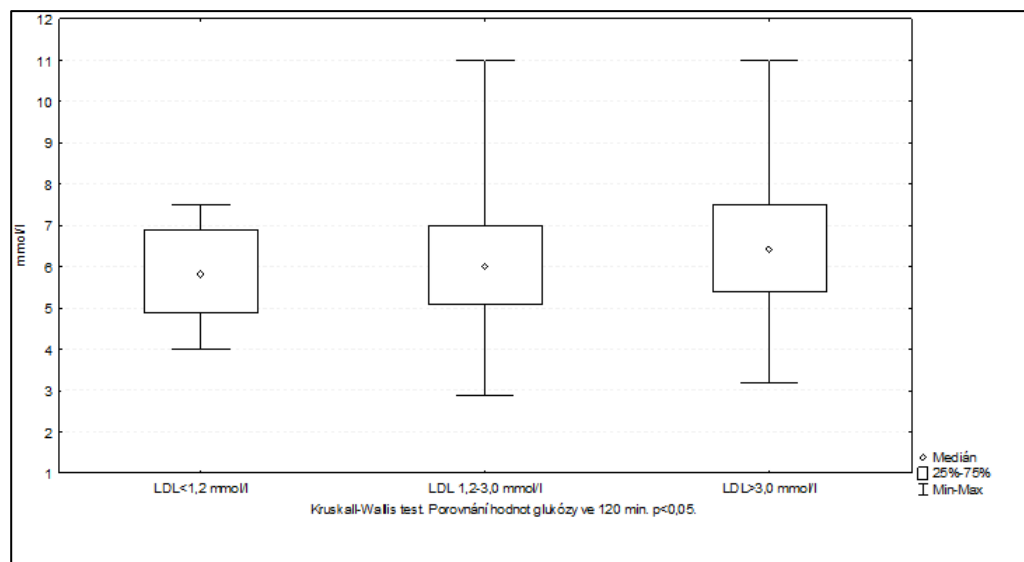
6.2.3. Změny koncentrace glukózy dle úrovně LDL



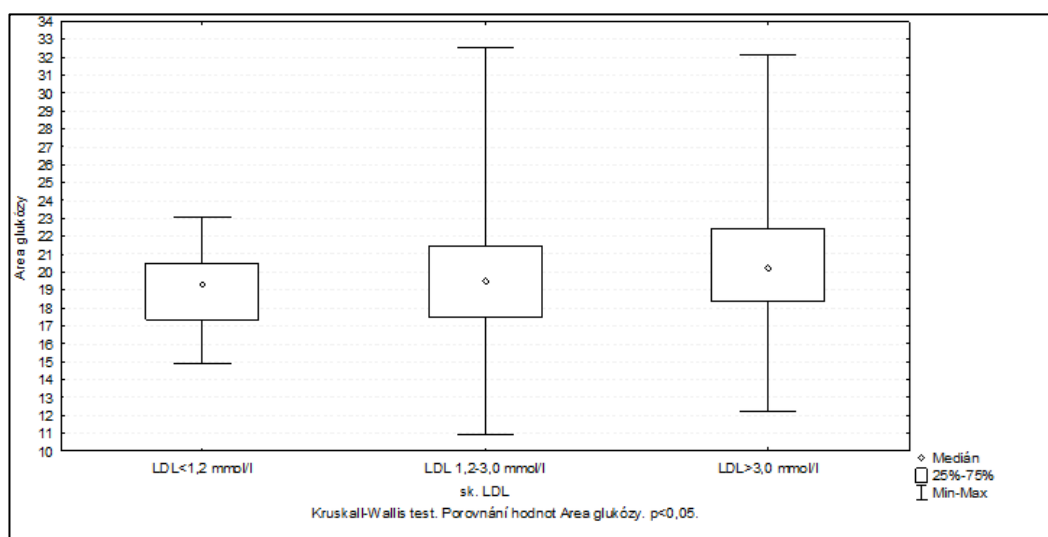
Obrázek č. 16. Změny koncentrací glukózy v čase 0 min v závislosti na úrovni LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl prokázán mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a >3,0 mmol/l.



Obrázek č. 17. Změny koncentrací glukózy v čase 60 min dle hladiny LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl prokázán mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a >3,0 mmol/l.



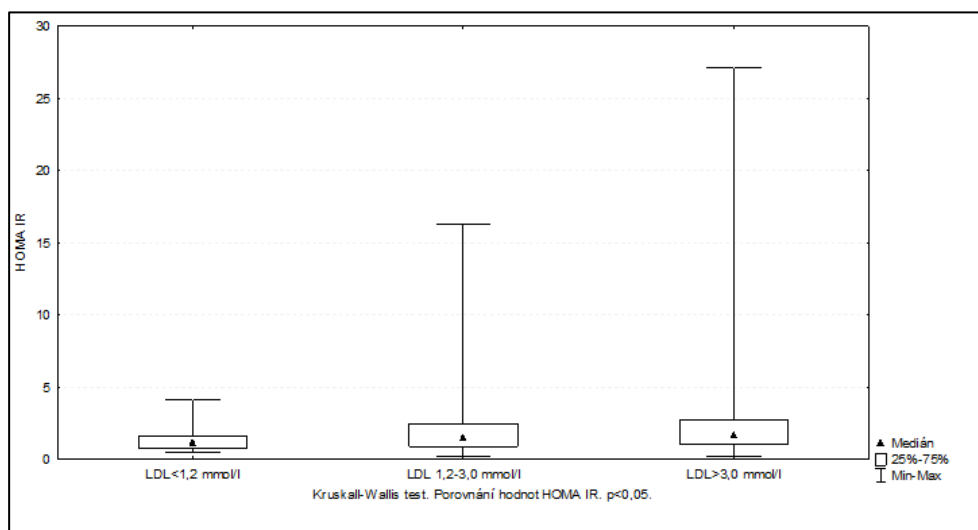
Obrázek č. 18. Změny koncentrací glukózy v čase 120 min dle hladiny LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl zjištěn mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a LDL >3,0 mmol/l ($p < 0,001$).



Obrázek č. 19. Změny parametru Area pro glukózu dle hladiny LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl prokázán mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a >3,0 mmol/l.

Kruskal-Wallisovy testy pro glukózu prokázaly statisticky významné rozdíly mezi skupinami LDL 1,2-3,0 mmol/l a >3,0 mmol/l v celém průběhu oGTT, viz výše tabulka číslo X. V 60 minutách byly pozorovány nejvyšší hodnoty glukózy u skupiny 1,2-3,0 mmol/l, na rozdíl od inzulinu v čase 60 min, kde jsou nejvyšší maximální hodnoty pozorované u hodnot LDL >3,0 mmol/l.

6.2.4 Změny indexu HOMA IR v závislosti na koncentraci LDL

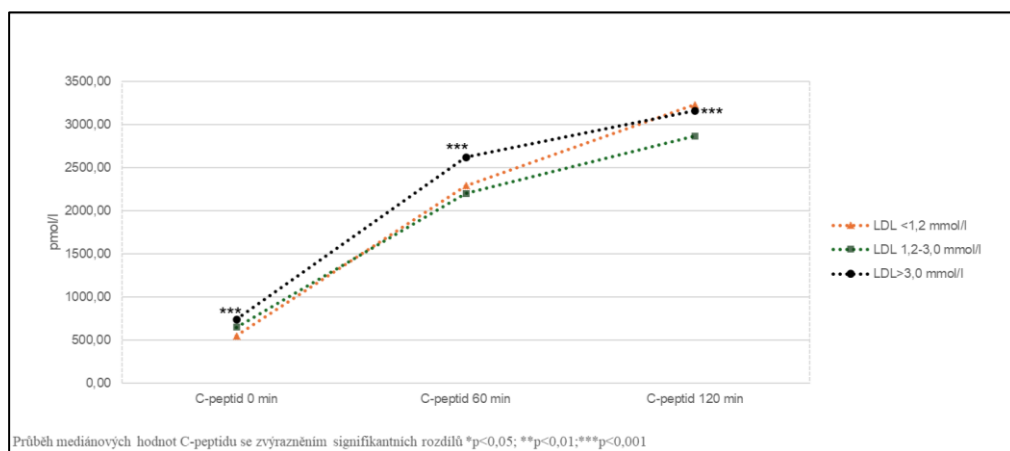


Obrázek č. 20. Změny indexu HOMA IR v závislosti na hladině LDL (Kruskal-Wallisův test). Signifikantní rozdíl prokázán mezi skupinami LDL < 1,2 mmol/l a > 3,0 mmol/l ($p < 0,05$) a LDL 1,2-3,0 mmol/l a > 3,0 mmol/l ($p < 0,001$).

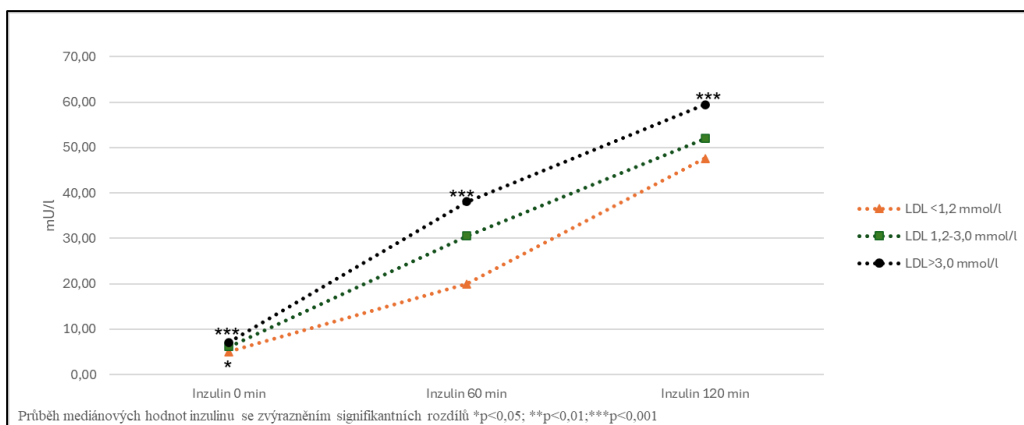
Signifikantní rozdíly lze nalézt také u parametru inzulinorezistence (parametr HOMA IR). Parametr HOMA IR dosahuje nejvyšších maximálních hodnot u skupiny s LDL > 3,0 mmol/l, zároveň je zde patrné největší rozpětí maximálních hodnot. Byl pozorován nárůst mediánových hodnot věku s rostoucí koncentrací LDL (viz Tabulky č. VII až IX).

6.3 Porovnání průběhu středních hodnot během oGTT dle skupin LDL

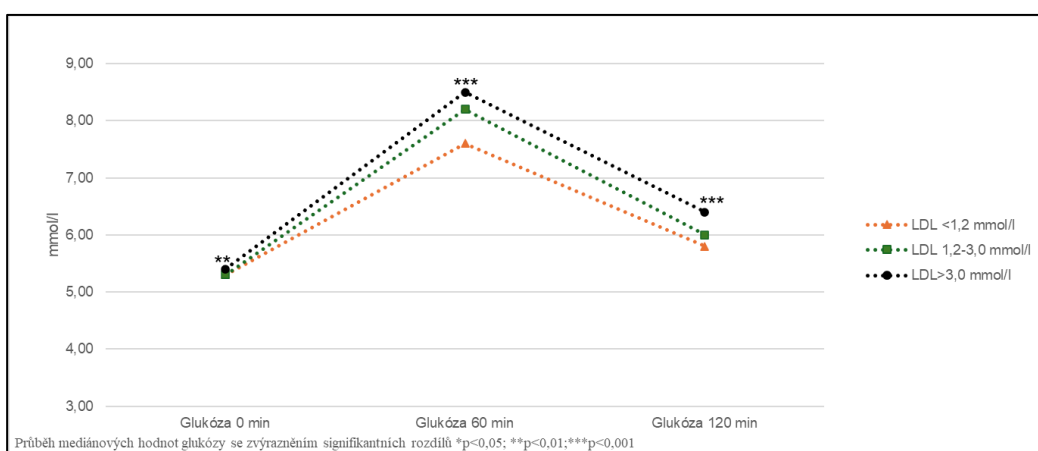
Grafy vytvořené v MS Excel znázorňují rozdíly mezi křivkami jednotlivých parametrů asociovaných s glukózou dle hodnot LDL.



Obrázek č. 22: Graf průběhu středních hodnot (mediánů) C-peptidu během oGTT dle hodnot LDL.



Obrázek č. 23: Graf průběhu středních (mediánových) hodnot inzulinu během oGTT dle hodnot LDL.



Obrázek č. 24: Graf průběhu průměrných hodnot glukózy během oGTT dle hodnot LDL.

Ve skupině s LDL <1,2 mmol/l je patrný růst mediánových hodnot C-peptidu během celého oGTT. Do 60. minuty je křivka velmi podobná s průběhem křivky pro skupinu patřící do referenčního rozmezí pro LDL. V první hodině testu však dochází ke zlomu, převýšení hodnoty mediánu v porovnání se skupinou LDL 1,2-3,0 mmol/l a ve 120. minutě lze vidět hodnoty mediánu blízké skupině s vysokým LDL. U křivky inzulinu je na začátku testu průkazný signifikantní rozdíl mezi mediány skupin s LDL <1,2 mmol/l a LDL >3,0 mmol/l. Dále však dochází k oddělení křivek pro každou skupinu, přičemž pro LDL <1,2 mmol/l je pozorovatelný nejpomalejší nárůst hodnot inzulinu do první hodiny testu, zde je opět patrný zlom a do druhé hodiny testu je nárůst hodnot rychlejší, než v první polovině testu. Stejně jako v případě inzulinu, i u glukózové křivky dochází k jejímu oddělení od křivek zbývajících skupin do 60. minuty testu. V tomto čase dochází k dosažení maximálních hodnot glukózy a poklesu na hodnoty blízké glykémii na lačno. Křivky inzulinu a glukózy vykazují u této skupiny nejnižší naměřené hodnoty.

Ve skupině s LDL 1,2-3,0 mmol/l lze pozorovat nejnižší medián C-peptidu v 60 minutách, od této chvíle má křivka zcela samostatný průběh v porovnání s ostatními skupinami a nejnižší medián C-peptidu byl zjištěn i ve 120. minutě testu. U křivky inzulinu je pozorován lineární, zcela samostatný průběh. Glukózová křivka dosahuje maxima v 60 minutách a poté dochází k poklesu, stejně jako v případě skupiny s nízkým LDL. Oproti této skupině je však křivka glukózy pro LDL 1,2-3,0 mmol/l strmější.

U skupiny s LDL > 3,0 mmol/l průběh glukózové křivky opět dosahuje maxima v 60 minutách a klesá do konce testu, opět jsou pozorovány nejvyšší mediánové hodnoty, lišící se signifikantně od skupiny referenčního rozmezí pro LDL v celém průběhu testu. Pro glukózu i inzulin je signifikantně rozdílný také parametr Area v porovnání s LDL 1,2-3,0 mmol/l.

7. Diskuze

Nízké hladiny LDL u zdravých dospělých mohou být spojeny nejčastěji s mutací genu APOB, není však jasné, zda a jaké zdravotní komplikace tento stav přináší (Jakubowski et al. 2021). Zmíněná studie zkoumala pouze 9 jedinců, takže lze říci, že nízké koncentrace LDL se v populaci vyskytují vzácně. Tomu odpovídají i výsledky diplomové práce, kdy do skupiny s nízkým LDL patřilo pouze 19 osob, jejichž hodnoty glycidových parametrů nevykazovaly signifikantní statistické rozdíly od skupiny s LDL 1,2-3,0 mmol/l. I vzhledem k limitovaným možnostem výzkumu nepatří nízké koncentrace LDL u lidí k předmětu intenzivního vědeckého zájmu a jejich přesná příčina dosud není zcela ověřena.

Z posledních let jsou známy studie, které poukázaly na význam měření glykémie v první hodině oGTT testu, jakožto užitečného prediktoru rizika rozvoje diabetu. Manco et al. analyzovali výsledky oGTT a euglykemického-hyperinzulinemického clampu u 1205 osob bez historie diabetu a porušené glukózové tolerance. Bylo zjištěno, že glykémie v první hodině testu překračující 8,95 mmol/l je asociována s vyššími hodnotami LDL ($3,1 \pm 0,8$ mmol/l) a glykemií na lačno ($5,2 \pm 0,5$) (Manco et al., 2010). V souladu s výsledky, které jsou prezentovány výše se ukazuje, že skupina s vysokými hodnotami LDL ($3,7 \pm 0,6$) je spojena s vyššími hodnotami lačné glykémie ($5,4 \pm 0,6$). Další studie publikovaná o tři roky později hodnotila data přímých příbuzných diabetiků druhého typu. Celkem 926 osob bylo rozděleno do tří skupin na základě glukózové tolerance: normální glukózová tolerance, porušená glukózová tolerance (IGT, z angl. impaired glucose tolerance) a zvýšená glykémie nalačno (z angl. impaired fasting glucose pochází zkratka IFG, užívaná dále). U osob

s normální glukózovou tolerancí, jejichž naměřená glykémie v 60. minutě oGTT testu přesahuje hodnotu 8,6 mmol/l (po přepočtu na tyto jednotky), byly hodnoty LDL cholesterolu vyšší než u osob nepřekračující tuto hodnotu (viz Tabulka číslo XII.). Překročení výše uvedené meze naznačovalo redukci první fáze sekrece inzulinu a inzulinovou senzitivitu srovnatelnou s osobami patřící do skupiny IFG. V porovnání s osobami s porušenou glukózovou tolerancí se objevila u těchto osob lepší funkce beta buněk. Porovnání vybraných parametrů, přepočtených na mmol/l, uvádí tabulka číslo XII.

Tabulka číslo XII. Srovnání středních hodnot vybraných parametrů mezi skupinami ze studie Bianchi et al., 2013.

Skupina	NGT pod 8,6 mmol/l v 1. hod oGTT	NGT nad 8,6 mmol/l v 1. hod oGTT	IFG
Počet	254	179	214
Celkový cholesterol	5,32	5,43	5,50
LDL cholesterol	3,29	3,52	3,52

NGT=normal glucose tolerance, IFG=impaired fasting glucose

Autoři poukazují na soulad výsledků s dříve provedenými studiemi, které byly provedeny a využily stejnou „cut-off“ hodnotu glukózy v 60. minutě oGTT. Protože je vysoká pravděpodobnost, že u dotyčných osob dojde k rozvoji diabetu, navrhuji autoři užití parametru glukózy měřené v první hodině testu jakožto markeru užitečného k identifikaci těchto osob (Bianchi et al., 2013). V souladu s výše citovanou studií a použitou cut-off pro glukózu v 1. hodině testu jsou i výsledky této diplomové práce: ve skupině s LDL >3,0 mmol/l byl medián glukózy 8,5 mmol/l. Dvanáct let trvající studie, ve které byl oGTT test opakován každé dva roky u 5703 participantů, stanovila cut-off pro glukózu v 60 minutách na 8,0 mmol/l, se 70% senzitivitou a 68% specifitou. Riziko rozvoje diabetu při překročení této cut-off bylo 2,84x vyšší, přičemž diabetes mellitus se rozvinul u 10,3 % účastníků, přibližně po 6 letech od začátku studie (Oh et al., 2017). Průměrné hodnoty LDL cholesterolu u osob zahrnutých do této studie byly 3,0±0,9 mmol/l. Střední hodnoty vyšší než cut-off určena touto studií jsou pozorovány v této diplomové práci nejen u osob s vysokým LDL (glukóza v 60 min 8,5), tak u osob s hodnotami LDL v referenčním rozmezí (medián glukózy v 60 min 8,2). Zde je třeba zohlednit etnický původ dlouhodobé prospektivní studie (Asie), stejně jako rozdíly ve skladbě stravy a způsobu života.

Jednoznačný vztah mezi hodnotami glukózy a LDL cholesterolu u nediabetické populace, s ohledem na predikci diabetu mellitus typu 2, není jasně definovaný. Historicky studie ukazují, že hodnoty LDL cholesterolu se neliší mezi diabetiky a zdravými kontrolami (Kannel, 1985). Rovněž Nelson et al. usuzují, že samotný marker-LDL cholesterol není dostačující pro predikci diabetu (Nelson et al., 2017). V posledních letech byla naopak publikována studie naznačující protektivní vliv LDL cholesterolu u zdravých osob s hodnotou glukózy na lačno mezi 5,6 a 6,1 mmol/l (mírně porušená glukózová tolerance) a také osob s lačnou hodnotou glykémie mezi 6,1 a 7,00 mmol/l (porušená glukózová tolerance). Jako rizikový faktor pro rozvoj diabetu mellitus byl identifikován celkový cholesterol pro osoby i s jen mírně porušenou glukózovou tolerancí. Mezi další rizikové faktory patří vyšší věk, nadváha nebo obezita a vysoký krevní tlak (Han et al. 2020). I zde je nutno posuzovat výsledky a zjištěné hodnoty s ohledem na studovanou populaci. Průměrné hodnoty LDL cholesterolu v jednotlivých skupinách dle glukózové tolerance výše citované publikace uvádí tabulka číslo XI.

Tabulka číslo XI. Přehled průměrných hodnot LDL cholesterolu v jednotlivých skupinách dle lačné hodnoty glykémie ve studii Han et al., 2020.

Skupina	FBG <5,6mmol/l	5,6 mmol/l >FBG< 6,1 mmol/l	6,1 mmol/l <FBG> 7,00 mmol/l
Střední hodnota LDL cholesterolu	2,7 mmol/l	3,1 mmol/l	3,1 mmol/l

FBG=fasting blood glucose

Na základě analýzy výsledků a guidelines pro hodnocení glukózové tolerance (Tabulka č. XI.) lze konstatovat, že v rámci diplomové práce jsou hodnocena data osob s normální glukózovou tolerancí, a to bez ohledu na úroveň LDL.

Vyhodnocení parametru Area inzulínu v této práci, dle metodiky zavedené v práci La Valle et al. z roku 2023 ukazuje, že k překročení cut-off, stanovené na 535 μ U/ml, došlo pouze u skupiny s vysokým LDL. Maximální zjištěná hodnota byla 644,8. Medián byl však pětikrát nižší (107 mU/l). Zde je nutno zmínit, že výše zmíněná cut-off se vztahovala na adolescentní populaci (La Valle et al., 2023).

Význam stanovení C-peptidu se v posledních letech skloňuje mimo obor diabetologie v souvislosti se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění u zdravých osob. Velmi aktuální studie provedená ve Švédsku ukazuje na korelaci mezi hodnotami C-peptidu a apoB ($r=0,636$), pokud byly z hodnocení vyřazeny osoby s nadváhou. Při zahrnutí všech zúčastněných osob ($n=28$), byla dále nalezena korelace mezi C-peptidem a LDL cholesterolem ($r=0,550$). Medián LDL cholesterolu v této studii byl 2,55, C-peptidu (měřený pouze na lačno) 650 pmol/l. Důležité je zmínit, že se věk dobrovolníků analyzovaných v této studii pohyboval mezi 30 až 50 lety. Limitací je však nízký počet analyzovaných jedinců (Whisset al., 2025). Téměř stejné mediánové hodnoty uvedených parametrů byly zjištěny v této práci u skupiny s LDL 1,2-3,0 mmol/l (LDL 2,5 mmol/l, C-peptid 0 min 650,0 mmol/l). U normoglykemických, obézních osob byly zjištěny vyšší koncentrace C-peptidu a nižší inzulinosenzitivita v souvislosti s hodnotami apoB překračujícími 1,14 g/l, tj. 80. percentil (Bissonnette et al., 2015).

Závěr

Teoretická část práce shrnuje základní informace o lipoproteinech a dostupných metodách pro jejich stanovení se zaměřením na LDL cholesterol. Dále jsou představeny neesterifikované mastné kyseliny a jejich role ve vzniku lipotoxického efektu. Mezi molekulární mechanismy lipotoxického efektu, které byly doloženy vědeckými studiemi, patří stres endoplazmatického retikula, oxidační stres a mitochondriální dysfunkce, syntéza ceramidů a ovlivnění FeS klastrů. Praktická část práce hodnotí soubor 1771 jedinců. Analyzovány byly parametry asociované s glukózou: C-peptid, inzulin a samotná glukóza během standardizovaného oGTT. Pro každý jmenovaný parametr byl hodnocen také parametr Area. Dále došlo k vyhodnocení parametru HOMA IR a věku jakožto doplňkového parametru, stejně jako samotného LDL cholesterolu. Metodika a výsledky této diplomové práce ukazují, že nejvíce osob s glykemií $>11,1$ mmol/l ve 120. minutě testu se nacházelo ve skupině s LDL nad horní hranicí referenčního rozmezí. Zároveň je pozorován nárůst mediánových a maximálních hodnot indexu HOMA IR. Dále je patrný nárůst rozpětí zjištěných hodnot v přítomnosti vysokého LDL. Křivky mediánových hodnot jednotlivých parametrů ukazují na patrný odstup skupiny s $\text{LDL} > 3,0$ mmol/l směrem k vyšším hodnotám po zátěži glukózou. Tento rozdíl byl dokázán Kruskal-Wallisovými testy pro každý parametr. Tím je poukázáno na význam stanovení LDL v kombinaci s glycidovými parametry po zátěži glukózou. V návaznosti na dříve provedené studie tato diplomová práce ukazuje, že osoby s hodnotami LDL vyšší než 3 mmol/l mohou dosahovat na cut-off hodnotu glykémie v 60. minutách oGTT, představující vyšší riziko vzniku diabetu. Na základě dostupných poznatků o mechanismech lipotoxického efektu a výsledků této diplomové práce, rozvoj lipotoxického efektu u jedinců s fyziologickým metabolismem sacharidů by mohl být zapříčiněn kombinací vyššího věku, přítomné inzulinorezistence a $\text{LDL} > 3,0$ mmol/l.

Zkratky:

ACL ATP-citrát-(pro-S)-lyáza

AMPK proteinová kináza aktivovaná AMP

ApoB₄₈ apolipoprotein B₄₈

ApoB₁₀₀ apolipoprotein B₁₀₀

AT1R angiotenzin II receptoru typu 1

ATF6 aktivační transkripční faktor 6

CD 36 cluster of differentiation 36

CETP cholesterol ester transfer protein

CGLC Kapilární plynová chromatografie

COX-2 cyclooxygenáza 2

DM diabetes mellitus

GPR40 receptor spřažený s G-proteinem 40

GPx 4 glutathion peroxidáza 4

HLP III hyperlipoproteinémie III

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A

HNF1 α hepatocytární nukleární faktor 1 alfa

HOMA IR Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

CHOP C/EBP homologní protein

IDL lipoproteiny střední hustoty

LDL lipoproteiny nízké hustoty

LP lipoproteinová lipáza

NEFA neesterifikované mastné kyseliny

NMR nukleární magnetická rezonance

H₂O₂ peroxid vodíku

IEF isoelektrická fokusace

IL 6 interleukin 6

ISC iron-sulfur cluster assembly machinery

IRE iron regulatory element

IRE-1 inositol requiring ER to nukleus signal kinase 1

IRP1 iron regulatory protein 1

IRS-1 insulin receptor substrát

JNK c-jun N-terminal kináza

NF-kB nukleární faktor kappa B

RFLP Restriction fragment length polymorfism

PDX-1 pancreatic and duodenal homeobox 1

PERK PKR like-ER kináza

PI3K phosphatidyl inositol 3 kináza

PMCA Plasma membrane Ca^{2+} ATPase

SERCA ER Ca^{2+} ATPáza

XBP1 X-box binding protein 1

Literatura

Acosta-Montaño P, Rodríguez-Velázquez E, Ibarra-López E, Frayde-Gómez H, Mas-Oliva J, Delgado-Coello B, Rivero IA, Alatorre-Meda M, Aguilera J, Guevara-Olaya L, García-González V. Fatty Acid and Lipopolysaccharide Effect on Beta Cells Proteostasis and its Impact on Insulin Secretion. *Cells*. 2019 Aug 13;8(8):884. doi: 10.3390/cells8080884.

Annerén C, Welsh M, Jansson L. Glucose intolerance and reduced islet blood flow in transgenic mice expressing the FRK tyrosine kinase under the control of the rat insulin promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Apr;292(4):E1183-90. doi: 10.1152/ajpendo.00168.2006.

Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G. Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1. *PLoS One*. 2009;4(3):e4954. doi: 10.1371/journal.pone.0004954. Epub 2009 Mar 23.

Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Semolic A, Chendi E, Ius M, Situlin R, Zanetti M, Vinci P, Guarnieri G. The association between hematological parameters and insulin resistance is modified by body mass index-results from the North-East Italy MoMa population study. *PLoS One*. 2014 Jul 7;9(7):e101590. doi: 10.1371/journal.pone.0101590.

Bianchi C, Miccoli R, Trombetta M, Giorgino F, Frontoni S, Faloia E, Marchesini G, Dolci MA, Cavalot F, Cavallo G, Leonetti F, Bonadonna RC, Del Prato S; GENFIEV Investigators. Elevated 1-hour postload plasma glucose levels identify subjects with normal glucose tolerance but impaired β -cell function, insulin resistance, and worse cardiovascular risk profile: the GENFIEV study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 May;98(5):2100-5. doi: 10.1210/jc.2012-3971. Epub 2013 Mar 28

Bissonnette S, Saint-Pierre N, Lamantia V, Cyr Y, Wassef H, Faraj M. Plasma IL-1Ra: linking hyperapoB to risk factors for type 2 diabetes independent of obesity in humans. *Nutr Diabetes*. 2015 Sep 28;5(9):e180. doi: 10.1038/nutd.2015.30.

Blasiole, D.A.; Davis, R.A.; Attie, A.D. The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol. Biosyst*. 2007, 3, 608–619.

Boden G, Chen X. Effects of fatty acids and ketone bodies on basal insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48:577–583

Brault M, Ray J, Gomez YH, Mantzoros CS, Daskalopoulou SS. Statin treatment and new-onset diabetes: a review of proposed mechanisms. *Metabolism*. 2014 Jun;63(6):735-45. doi: 10.1016/j.metabol.2014.02.014. Epub 2014 Feb 25.

Braymer, J.J.; Lill, R. Iron–sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 12754–12763.

Brown MS & Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232, 34–47.

Benido Silva V, Chaves C, Oliveira JC, Palma I. Comparison of the accuracy of the Friedewald, Martin, and Sampson formulas to estimate very low levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Endokrynol Pol.* 2023;74(2):203-210. doi: 10.5603/EP.a2023.0025.

Camaschella, C.; Campanella, A.; De Falco, L.; Boschetto, L.; Merlini, R.; Silvestri, L.; Levi, S.; Iolascon, A. The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 2007, 110, 1353–1358.

Cell BioLabs, Inc. Product manual LDL/VLDL Purification Kit (Ultracentrifugation free). dostupné online z www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-606-ldl-vldl-purification-kit.pdf. staženo [10/21/2024]

Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci.* 2008 Jul 15;121(Pt 14):2308-18. doi: 10.1242/jcs.026062. Epub 2008 Jun 17.

Clarke DC, Miskovic D, Han XX, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, Heikkila JJ, Bonen A. Overexpression of membrane-associated fatty acid binding protein (FABPpm) in vivo increases fatty acid sarcolemmal transport and metabolism. *Physiol Genomics*. 2004 Mar 12;17(1):31-7. doi: 10.1152/physiolgenomics.00190.2003

Češka, Richard. Číslo LDL žije! *AtheroRev* 2021; 6(2): 84–89. dostupné online z: www.prolekare.cz/casopisy/athero-review/2021-2-14/cislo-ldl-zije-127328/download?hl=cs. staženo [8/20/2024].

Dannecker C, Wagner R, Peter A, Hummel J, Vosseler A, Häring HU, Fritsche A, Birkenfeld AL, Stefan N, Heni M. Low-Density Lipoprotein Cholesterol Is Associated With Insulin Secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 May 13;106(6):1576-1584. doi: 10.1210/clinem/dgab147.

Dixon, S.J.; Lemberg, K.M.; Lamprecht, M.R.; Skouta, R.; Zaitsev, E.M.; Gleason, C.E.; Patel, D.N.; Bauer, A.J.; Cantley, A.M.; Yang, W.S.; et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012, 149, 1060–1072.

Eitel K, Staiger H, Brendel MD, et al. Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299:853–856.

Ferrannini E, Balkau B, Coppack SW, Dekker JM, Mari A, Nolan J, Walker M, Natali A, Beck-Nielsen H; RISC Investigators. Insulin resistance, insulin response, and obesity as indicators of metabolic risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):2885-92. doi: 10.1210/jc.2007-0334. Epub 2007 May 15.

FONS. Popis vyšetření: LDL cholesterol. Příručka laboratorních vyšetření. Dostupné online z stara.cskb.cz/plv/Produkty/21F03666-2CFB-4E57-89E6-D44237CFB576.html staženo [10/25/2024].

Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis*. 1994 Apr;106(2):241-53. doi: 10.1016/0021-9150(94)90129-5.

Guevara-Olaya L, Chimal-Vega B, Castañeda-Sánchez CY, López-Cossio LY, Pulido-Capiz A, Galindo-Hernández O, Díaz-Molina R, Ruiz Esparza-Cisneros J, García-González V. LDL Promotes Disorders in β -Cell Cholesterol Metabolism, Implications on Insulin Cellular Communication Mediated by EVs. *Metabolites*. 2022 Aug 16;12(8):754. doi: 10.3390/metabo12080754.

Han Y, Zhang S, Chen S, Zhang J, Guo X, Yang X. Incidence and risk factors of type 2 diabetes mellitus in individuals with different fasting plasma glucose levels. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2020 Jun 10;11:2042018820928844. doi: 10.1177/2042018820928844.

Horáková D, Štěpánek L, Janout V, Janoutová J, Pastucha D, Kollárová H, Petráková A, Štěpánek L, Husár R, Martiník K. Optimal Homeostasis Model Assessment of Insulin

Resistance (HOMA-IR) Cut-Offs: A Cross-Sectional Study in the Czech Population. *Medicina (Kaunas)*. 2019 May 17;55(5):158. doi: 10.3390/medicina55050158.

Chen Y, Ren Q, Zhou Z, Deng L, Hu L, Zhang L, Li Z. HWL-088, a new potent free fatty acid receptor 1 (FFAR1) agonist, improves glucolipid metabolism and acts additively with metformin in ob/ob diabetic mice. *Br J Pharmacol*. 2020 May;177(10):2286-2302. doi: 10.1111/bph.14980. Epub 2020 Feb 8.

Chiang, John. Liver Physiology: Metabolism and Detoxification. 10.1016/B978-0-12-386456-7.04202-7. 2024, dostupné online [staženo 16.10.2024] www.researchgate.net/publication/271910276_Liver_Physiology_Metabolism_and_Detoxification

Chrysant SG. New onset diabetes mellitus induced by statins: current evidence. *Postgrad Med*. 2017 May;129(4):430-435. doi: 10.1080/00325481.2017.1292107. Epub 2017 Feb 24.

International Diabetes Federation. Facts and Figures. Online, dostupné z: idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures. staženo [3/6/2025].

Ishigaki H, Yoshida A, Araki O, Kimura T, Tsunekawa K, Shoho Y, Nara M, Aoki T, Ogiwara T, Murakami M. Prolonged plasma glucose elevation on oral glucose tolerance test in young healthy Japanese individuals. *Endocrinol Diabetes Metab*. 2019 Oct 28;3(1):e00098. doi: 10.1002/edm2.98.

Jakubowski B, Shao Y, McNeal C, Xing C, Ahmad Z. Monogenic and polygenic causes of low and extremely low LDL-C levels in patients referred to specialty lipid clinics: Genetics of low LDL-C. *J Clin Lipidol*. 2021 Sep-Oct;15(5):658-664. doi: 10.1016/j.jacl.2021.07.003. Epub 2021 Jul 17.

Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham study. *Am Heart J* 1985; 110: 1100–1107.

Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:2461–247

Kounatidis D, Vallianou NG, Poulaki A, Evangelopoulos A, Panagopoulos F, Stratigou T, Geladari E, Karampela I, Dalamaga M. ApoB100 and Atherosclerosis: What's New in the 21st Century? *Metabolites*. 2024 Feb 12;14(2):123. doi: 10.3390/metabo14020123.

Kouvari M, Chrysohou C, Skoumas J, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Mantzoros CS; ATTICA study Investigators. The presence of NAFLD influences the transition of metabolically healthy to metabolically unhealthy obesity and the ten-year cardiovascular

disease risk: A population-based cohort study. *Metabolism*. 2022 Mar;128:154893. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154893

Kulkarni, C.M. & Patil, Sumangala. Role of C-peptide in Altered Lipid Profile among Apparently Healthy Adults of Vijayapura City, Karnataka. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*. 2016 (5):79-86.

Kristinsson H, Sargsyan E, Manell H, Smith DM, Göpel SO, Bergsten P. Basal hypersecretion of glucagon and insulin from palmitate-exposed human islets depends on FFAR1 but not decreased somatostatin secretion. *Sci Rep*. 2017 Jul 5;7(1):4657. doi: 10.1038/s41598-017-04730-5.

Kron V, Verner M, Pesl L, Smetana P, Kadlec J, Martinik D. Cholesterol and glucose profiles according to different fasting C-peptide levels: a cross-sectional analysis in a healthy cohort from the Czech Republic. *J Appl Biomed*. 2021 Dec;19(4):220-227. doi: 10.32725/jab.2021.023. Epub 2021 Oct 13.

La Valle A, d'Annunzio G, Campanello C, Tantari G, Pistorio A, Napoli F, Patti G, Crocco M, Bassi M, Minuto N, Piccolo G, Maghnie M. Are glucose and insulin levels at all time points during OGTT a reliable marker of diabetes mellitus risk in pediatric obesity? *J Endocrinol Invest*. 2023 Aug;46(8):1685-1694. doi: 10.1007/s40618-023-02030-6. Epub 2023 Feb 10.

Laufs U, Banach M, Mancini GBJ, Gaudet D, Bloedon LT, Sterling LR, Kelly S, Stroes ESG. Efficacy and Safety of Bempedoic Acid in Patients With Hypercholesterolemia and Statin Intolerance. *J Am Heart Assoc*. 2019 Apr 2;8(7):e011662. doi: 10.1161/JAHA.118.011662.

Lee JH, Jung IR, Choi SE, Lee SM, Lee SJ, Han SJ, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW, Kang Y. Toxicity generated through inhibition of pyruvate carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 is similar to high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity in INS-1 beta cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Mar 5;383(1-2):48-59. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.002. Epub 2013 Dec 11.

Li F, Munsey TS, Sivaprasadarao A. TRPM2-mediated rise in mitochondrial Zn²⁺ promotes palmitate-induced mitochondrial fission and pancreatic β -cell death in rodents. *Cell Death Differ*. 2017 Dec;24(12):1999-2012. doi: 10.1038/cdd.2017.118. Epub 2017 Jul 28.

Ly, L.D.; Da Ly, D.; Nguyen, N.T.; Kim, J.H.; Yoo, H.; Chung, J.; Lee, M.S.; Cha, S.K.; Park, K.S. Mitochondrial Ca^{2+} Uptake Relieves Palmitate-Induced Cytosolic Ca^{2+} Overload in MIN6 Cells. *Mol. Cells* 2020, 43, 66–75.

Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol*. 2011 Feb 23;4:8. doi: 10.1186/1756-8722-4-8.

Lund-Katz S, Laplaud PM, Phillips MC, Chapman MJ. Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry*. 1998 Sep 15;37(37):12867-74. doi: 10.1021/bi980828m.

Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 2002; 51:1437–1442.

Lv ZH, Ma P, Luo W, Xiong H, Han L, Li SW, Zhou X, Tu JC. Association between serum free fatty acid levels and possible related factors in patients with type 2 diabetes mellitus and acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014 Nov 14;14:159. doi: 10.1186/1471-2261-14-159.

Ly LD, Xu S, Choi SK, Ha CM, Thoudam T, Cha SK, Wiederkehr A, Wollheim CB, Lee IK, Park KS. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med*. 2017 Feb 3;49(2):e291. doi: 10.1038/emm.2016.157.

Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes*. 2001 Jan;50(1):69-76. doi: 10.2337/diabetes.50.1.69.

Mancini AD, Poitout V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends Endocrinol Metab*. 2013 Aug;24(8):398-407. doi: 10.1016/j.tem.2013.03.003. Epub 2013 Apr 27.

Manco M, Panunzi S, Macfarlane DP, Golay A, Melander O, Konrad T, Petrie JR, Mingrone G; Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular Risk (RISC) Consortium. One-hour plasma glucose identifies insulin resistance and beta-cell dysfunction in individuals with normal glucose tolerance: cross-sectional data from the Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular Risk (RISC) study. *Diabetes Care*. 2010 Sep;33(9):2090-7. doi: 10.2337/dc09-2261

MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Část 1. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-648-1.

Morita, S.Y. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* 2016, 39, 1–24.

Natali A, Baldi S, Bonnet F, Petrie J, Trifirò S, Tricò D, Mari A; RISC Investigators. Plasma HDL-cholesterol and triglycerides, but not LDL-cholesterol, are associated with insulin secretion in non-diabetic subjects. *Metabolism*. 2017 Apr;69:33-42. doi: 10.1016/j.metabol.2017.01.001. Epub 2017 Jan 6.

Nelson AJ, Rochelau SK, Nicholls SJ. Managing Dyslipidemia in Type 2 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2018 Mar;47(1):153-173. doi: 10.1016/j.ecl.2017.10.004. Epub 2017 Dec 20.

Oh TJ, Lim S, Kim KM, Moon JH, Choi SH, Cho YM, Park KS, Jang H, Cho NH. One-hour postload plasma glucose concentration in people with normal glucose homeostasis predicts future diabetes mellitus: a 12-year community-based cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017 Apr;86(4):513-519. doi: 10.1111/cen.13280.

Okamura DM, Pennathur S, Pasichnyk K, López-Guisa JM, Collins S, Febbraio M, Heinecke J, Eddy AA. CD36 regulates oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Mar;20(3):495-505. doi: 10.1681/ASN.2008010009. Epub 2009 Feb 11.

Petry SF, Sun LM, Knapp A, Reinl S, Linn T. Distinct Shift in Beta-Cell Glutaredoxin 5 Expression Is Mediated by Hypoxia and Lipotoxicity Both *In Vivo* and *In Vitro*. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Mar 12;9:84. doi: 10.3389/fendo.2018.00084.

Pepino MY, Kuda O, Samovski D, Abumrad NA. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:281-303. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161220. Epub 2014 May 16.

Plötz T, von Hanstein AS, Krümmel B, Laporte A, Mehmeti I, Lenzen S. Structure-toxicity relationships of saturated and unsaturated free fatty acids for elucidating the lipotoxic effects in human EndoC-βH1 beta-cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019 Nov 1;1865(11):165525. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.08.001. Epub 2019 Aug 6.

Pinkosky SL, Newton RS, Day EA, Ford RJ, Lhotak S, Austin RC, Birch CM, Smith BK, Filippov S, Groot PHE, Steinberg GR, Lalwani ND. Liver-specific ATP-citrate lyase inhibition by bempedoic acid decreases LDL-C and attenuates atherosclerosis. *Nat Commun*. 2016 Nov 28;7:13457. doi: 10.1038/ncomms13457.

Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 2008 May;29(3):351-66. doi: 10.1210/er.2007-0023. Epub 2007 Nov 29.

Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*. 2006 Aug;2(8):406-14. doi: 10.1038/nchembio807.

Römer A, Linn T, Petry SF. Lipotoxic Impairment of Mitochondrial Function in β -Cells: A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 15;10(2):293. doi: 10.3390/antiox10020293.

Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJ, Hardie DG. AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem J*. 1998 Nov 1;335 (Pt 3)(Pt 3):533-9. doi: 10.1042/bj3350533.

Soška, Vladimír. Měření cholesterolu a současná doporučení. *Vnitřní Lékařství* 2022;68(1):54-57. Dostupné z: www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2022/01/07.pdf (casopisvnitrnilekarstvi.cz) staženo [3/18/2024].

Stehling O, Wilbrecht C, Lill R. Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*. 2014 May;100:61-77. doi: 10.1016/j.biochi.2014.01.010. Epub 2014 Jan 23.

SVAČINA, Štěpán. Poruchy metabolismu a výživy. Praha: Galén, c2010, 249-250. ISBN 978-80-7262-676-2.

Takaguri A, Satoh K, Itagaki M, Tokumitsu Y, Ichihara K. Effects of atorvastatin and pravastatin on signal transduction related to glucose uptake in 3T3L1 adipocytes. *J Pharmacol Sci*. 2008 May;107(1):80-9. doi: 10.1254/jphs.fp0072403. Epub 2008 May 9.

Talley JT, Mohiuddin SS. Biochemistry, Fatty Acid Oxidation. 2023 Jan 16. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan—.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové. www.fnhk.cz/ukbd staženo [3/7/2024]

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové. Metoda- Glukózový toleranční test. Staženo [11/22/2024] Dostupné z: <http://ukbd.fnhk.cz/metoda-glukozovy-toleranci-test>

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové: Metoda Glukóza. Staženo [3/3/2025]. Dostupné z: <http://ukbd.fnhk.eu/metoda-glukoza.html>

Metoda Inzulin. Staženo [3/3/2025]. Dostupné z: <http://ukbd.fnhk.eu/metoda-inzulin.html>

Metoda C-peptid. Staženo [3/3/2025]. Dostupné z: <http://ukbd.fnhk.eu/metoda-c-peptid.html>

van Raalte, Daniël H; van der Zijl, Nynke J; Diamant, Michaela (2010). Pancreatic steatosis in humans: cause or marker of lipotoxicity?. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(4), 478–485. doi:10.1097/mco.0b013e32833aa1ef.

Wagenknecht LE, Langefeld CD, Scherzinger AL, Norris JM, Haffner SM, Saad MF, Bergman RN. Insulin sensitivity, insulin secretion, and abdominal fat: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family Study. *Diabetes*. 2003 Oct;52(10):2490-6. doi: 10.2337/diabetes.52.10.2490.

Waters DD, Ho JE, Boekholdt SM, DeMicco DA, Kastelein JJ, Messig M, Breazna A, Pedersen TR. Cardiovascular event reduction versus new-onset diabetes during atorvastatin therapy: effect of baseline risk factors for diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jan 15;61(2):148-52. doi: 10.1016/j.jacc.2012.09.042. Epub 2012 Dec 5. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2014 Nov 4;64(18):1970.

Wehinger S, Ortiz R, Díaz MI, Aguirre A, Valenzuela M, Llanos P, Mc Master C, Leyton L, Quest AF. Phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14 induced by ROS enhances palmitate-induced death of beta-pancreatic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1852(5):693-708. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.12.021. Epub 2015 Jan 5.

Westgard, QC. Quality Requirements. Desirable Biological Variation Database specifications. dostupné online: westgard.com/clia-a-quality/quality-requirements/biodatabase1.html. Staženo [10/13/2024].

Whiss PA, Baldimtsi E, Wahlberg J. Fasting plasma C-peptide correlates with body mass index, hsCRP, apolipoprotein B, and other atherogenic lipids in healthy individuals. *Physiol Rep*. 2025 Mar;13(6):e70282. doi: 10.14814/phy2.70282.

Xia F, Xie L, Mihic A, Gao X, Chen Y, Gaisano HY, Tsushima RG. Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2008 Oct;149(10):5136-45. doi: 10.1210/en.2008-0161. Epub 2008 Jul 3.

Xiao X, Luo Y, Peng D. Updated Understanding of the Crosstalk Between Glucose/Insulin and Cholesterol Metabolism. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Apr 29;9:879355. doi: 10.3389/fcvm.2022.879355.

Xu T, Brandmaier S, Messias AC, Herder C, Draisma HH, Demirkan A, Yu Z, Ried JS, Haller T, Heier M, Campillos M, Fobo G, Stark R, Holzapfel C, Adam J, Chi S, Rotter M, Panni T, Quante AS, He Y, Prehn C, Roemisch-Margl W, Kastenmüller G, Willemsen G, Pool R, Kasa K, van Dijk KW, Hankemeier T, Meisinger C, Thorand B, Ruepp A, Hrabé de Angelis M, Li Y, Wichmann HE, Stratmann B, Strauch K, Metspalu A, Gieger C, Suhre K, Adamski J, Illig T, Rathmann W, Roden M, Peters A, van Duijn CM, Boomsma DI, Meitinger T, Wang-Sattler R. Effects of metformin on metabolite profiles and LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Oct;38(10):1858-67.

Xu P, Qiao K, Stephanopoulos G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*. 2017 Jul;114(7):1521-1530. doi: 10.1002/bit.26285. Epub 2017 Apr 18.

Yoshida K, Kimura T, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Shoho Y, Nara M, Sumino H, Murakami M. Fasting serum insulin levels and insulin resistance are associated with blood rheology in Japanese young adults without diabetes. *J Int Med Res*. 2016 Jun;44(3):496-507. doi: 10.1177/0300060515627561. Epub 2016 Feb 26.

ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., str.174-176. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-062-2