



Studium exprese c-Fos v mozku myši po aplikaci modulátoru biologických reakcí

Bakalářská práce

Autor: Nováková Tereza
Studijní program: B1407 / Chemie
Studijní obor: Chemie a Biologie se zaměřením na vzdělávání
Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.
Odborný konzultant: RNDr. Klára Kubelková, Ph.D.



Zadání bakalářské práce

Autor: Tereza Nováková

Studium: S18CH120BP

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Biologie se zaměřením na vzdělávání, Chemie se zaměřením na vzdělávání

Název bakalářské práce: **Studium exprese c-Fos v mozku myši po aplikaci modulátoru biologických reakcí**

Název bakalářské práce AJ: The study of c-Fos expression in mouse brain after application of biological response modulator

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Řada biologických modulátorů imunitních reakcí pozitivně ovlivňuje skladbu střevní mikroflóry, která je velice úzce spjata s činností mozku hostitele, lze tedy předpokládat, že biologické modulátory mohou ovlivňovat osy mikrobiota-mozek-střevo. Tato bakalářská práce je zaměřena na studium exprese vybraného protoonkogenu c-Fos, který hraje důležitou roli v řadě biologických funkcí a jeho exprese se zvyšuje v průběhu různých nádorových onemocnění. Zaměření vlastní práce na molekula c-Fos je především z historického hlediska, kdy bylo prokázáno, že vybrané biologické modulátory mohou ovlivňovat expresi c-Fos v mozcích pokusných zvířat.

Zadání BP:

1. Vypracování rešerše na zadané téma
2. Studium vlivu Juvenilu na expresi c-Fos v myších mozcích
3. Zpracování výsledků studie v rámci praktické části BP, diskuse získaných výsledků

Kubelkova K. and Macela A.: Microbiota-gut-brain Signaling: a nimirreview. Med. Sci. Lett. 2020, 89(1):41-45.

Kubelkova K., Rychlik I., Crhanova M., Karasova D., Slizova D., Zakova J., Luksikova L., and Macela A.: Gut microbiota alterations by nutritional supplement Juvenil. *Med. Sci. Lett.* 2020, 89(3):114-125.

Kubelkova K., Macela A.: A short history of Juvenil – an original tissue extract. *Med. Sci. Lett.* 2019, 88, 3, 115-120. doi: 10.31482/mmsl.2019.008

Duskova K., Cechakova L., Plzakova L., Sinkorova Z., Kubelkova K.: Natural immune booster Juvenil significantly affects the proliferation of tumor cells. *Med. Sci. Lett.* 2019, 88, 3, 106-114. doi: 10.31482/mmsl.2019.007.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,

Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové

Tereza Nováková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Mé poděkování patří též kpt. RNDr. Kláře Kubelkové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost při konzultacích a odborné vedení práce. Děkuji také pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D. za odborný dohled a pomoc při výzkumné části práce. Dále bych chtěla poděkovat firmě Juvenil Products a.s., Přezletice, ČR za poskytnutí extraktu Juvenil pro studium v rámci této bakalářské práce.

Anotace:

Řada biologických modulátorů imunitních reakcí pozitivně ovlivňuje skladbu střevní mikroflóry, která je velice úzce spjata s činností mozku hostitele, lze tedy předpokládat, že biologické modulátory mohou ovlivňovat osu mikrobiota-střevo-mozek. Tato bakalářská práce je zaměřena na studium exprese vybraného protoonkogenu c-Fos, který hraje důležitou roli v řadě biologických funkcí a jeho exprese se zvyšuje v průběhu různých nádorových onemocnění. Zaměření vlastní práce na molekula c-Fos je především z historického hlediska, kdy bylo prokázáno, že vybrané biologické modulátory mohou ovlivňovat expresi c-Fos v mozcích pokusných zvířat.

Klíčová slova: c-Fos, imunohistochemie, mikrobiom, biologický modulátor

Annotation:

Many biological modulators of immune responses positively affect the composition of the intestinal microflora, which is very closely related to the activity of the host brain, so it can be assumed that biological modulators can affect the microbiota-gut-brain axes. This bachelor thesis is focused on the study of the expression of the c-Fos molecule, selected proto-oncogene, which can play an important role in a number of biological functions and its expression increases during various cancers. The focus of our c-Fos work is mainly from a historical point of view, when it was shown that selected biological modulators can influence the expression of c-Fos in the brains of experimental animals

Key words: c-Fos, immunohistochemistry, microbiom, biological modulator

Obsah

Obsah	7
Seznam zkratk	10
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	12
1. Úvod	14
2. Cíle práce	15
3. Teoretická část	16
3.1 Molekula c-Fos	16
3.1.1 Vliv c-Fos na vývoj mozku myši	16
3.1.2 c-Fos jako marker neurální aktivity	17
3.2 Laboratorní myš, Balb/c	17
3.2.1 Střevní trakt myši	18
3.2.2 Střevní mikrobiom	18
3.3 Mozek myši	19
3.3.1 Anatomie mozku myši	20
3.3.2 Hipokampus	21
3.3.3 Thalamus	21
3.3.4 Hypothalamus	22
3.3.5 Amygdala	22
3.3.6 Piriformní kůra	22
3.3.7 Mozková kůra	22
3.4 Osa mikrobiota-střevo-mozek	22
3.4.1 Terapeutické využití osy mikrobiom-střevo-mozek	24
3.4.2 Onemocnění spojené se změnami střevního mikrobiomu	24
3.4.3 Infekce Clostridium difficile	24
3.4.4 Infekce HIV	25

3.4.5	Střevní mikrobiom a onemocnění jater.....	25
3.4.6	Kolorektální karcinom	25
3.4.7	Střevní mikrobiom a metabolické poruchy.....	25
3.4.8	Obezita	25
3.4.9	Diabetes mellitus druhého typu	26
3.4.10	Střevní mikrobiom a alergická onemocnění	26
3.4.11	Střevní mikrobiom a psychická onemocnění.....	26
3.5	Extrakt Juvenil	27
3.5.1	Výroba extraktu Juvenil.....	27
3.5.2	Využití extraktu Juvenil.....	27
3.5.3	Studie protinádorových účinků Juvenil	28
3.5.4	Nukleotidy	29
4.	Praktická část.....	31
4.1	Materiál a metodika.....	31
4.1.1	Seznam použitých chemikálií	31
4.1.2	Pokusná zvířata	32
4.1.3	Experimentální skupiny	32
4.1.4	Histologické vyšetření	32
4.1.5	Zhotovení preparátů	33
4.1.6	Odvodnění preparátů a zalití do parafínu	33
4.1.7	Natažení řezů na podložní skla	33
4.1.8	Odparafinování preparátů	34
4.1.9	Barvení hematoxylinem a eozinem.....	34
4.1.10	Fixace vzorků do bezvodého media.....	36
4.1.11	Histochemické barvení c-Fos.....	36
4.2	Hodnocení preparátů	38
4.2.1	Semikvantitativní hodnocení obrazu	39

4.2.2	Počítačová analýza obrazu.....	39
4.2.3	Prezentace výsledků a statistické hodnocení	40
5.	Výsledky.....	41
5.1	Hematoxylin-eozin.....	41
5.1.1	Detekce exprese c-Fos	41
5.1.2	Pozitivita buněk v oblasti CA2 hipokampu	44
5.1.3	c-Fos pozitivita buněk v gyrus dentatus hipokampu	45
5.1.4	c-Fos pozitivita buněk v oblasti thalamu (dorzomediální a ventrolaterální část laterodorzálních jader).....	46
5.1.5	c-Fos pozitivita buněk v oblasti hypothalamu (oblast dorsomedialních jádra)	47
5.1.6	c-Fos pozitivita buněk v oblasti amygdaly (centrální jádra).....	48
5.1.7	c-Fos pozitivita buněk v piriformní kůře	49
5.1.8	c-Fos pozitivita buněk v kortexu (primární motorická kůra M1)	50
6.	Diskuse	52
7.	Seznam literatury	54
8.	Seznam internetových zdrojů	59

Seznam zkratek

ATP – adenosintrifosfát

cAMP – 3',5'-adenosintrifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HIV – vir lidské imunodeficiency

RNA – ribonukleová kyselina

USA – Spojené státy americké

Seznam obrázků

Obrázek 1. Anatomický řez mozkiem myši	20
Obrázek 2. Anatomie mozku myši z bočního pohledu.....	21
Obrázek 3. Místa hodnocení exprese c-Fos v myších cílových strukturách mozku	39
Obrázek 4. Požadovaná neuroanatomická lokalizace	41
Obrázek 5. Oblast gyrus dentatus, kontrolní skupina.....	42
Obrázek 6. Oblast gyrus dentatus, skupina IMU.....	43
Obrázek 7. Oblast gyrus dentatus, skupina IMU/7.....	44

Seznam tabulek

Tabulka 1. Odvodnění tkáňových vzorků v lázních vzestupné řady etanolu, xylynu a parafínu	33
Tabulka 2. odparafinování v xylenových a etanolových lázních a deionizované vodě	34
Tabulka 3. Složení roztoku Gillova hematoxylinu	35
Tabulka 4. Postup diferenciacce a oplachu preparátů	35
Tabulka 5. Barvení preparátů eozinem a následné odvodňování	36
Tabulka 6. Roztok citrátového cyklu.....	36
Tabulka 7. Tlumicí roztok	37
Tabulka 8. Roztok kravského albuminu	37
Tabulka 9. Roztok diaminobenzidu.....	38
Tabulka 10. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v CA2 oblasti hipokampu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).....	45
Tabulka 11. Průměrné hodnoty denzity jader buněk v CA2 oblasti hipokampu měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).	45
Tabulka 12. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v gyrus dentatus hipokampu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).....	46
Tabulka 13. Průměrné hodnoty denzity jader buněk v gyrus dentatus hipokampu měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).	46
Tabulka 14. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v thalamu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).	47
Tabulka 15. Průměrné hodnoty denzity jader buněk v thalamu měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).	47
Tabulka 16. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v hypothalamu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).....	48
Tabulka 17. Průměrné hodnoty denzity jader buněk hypothalamu měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).....	48
Tabulka 18. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v amygdale (průměr $\pm 2 \times$ SEM)	49
Tabulka 19. Průměrné hodnoty denzity jader buněk amygdaly měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM)	49

Tabulka 20. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v piriformní kůře (průměr $\pm 2 \times$ SEM).....	50
Tabulka 21. Průměrné hodnoty denzity jader buněk piriformní kůry měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).	50
Tabulka 22. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v motorické kůře (průměr $\pm 2 \times$ SEM).....	51
Tabulka 23. Průměrné hodnoty denzity jader buněk motorické kůry měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).	51

1. Úvod

Symbioticky žije v lidském těle na miliardy mikroorganismů. Tyto mikroorganismy mohou mít na lidský organismus jak pozitivní, tak i negativní vliv. V posledních letech dochází ke zvýšení výzkumné pozornosti na vliv střevního mikrobiomu na stav lidského organismu. Některé studie objevily spojitost mezi civilizačními onemocněními a změnami střevní mikroflóry. Díky těmto novým informacím se začíná využívat pojem osa mikrobiota-střevo-mozek. Nově se také objevují studie zabývající se celkovým zlepšováním stavu organismu pomocí modulace střevního mikrobiomu. Jedním z měřitelných parametrů pozitivního vlivu modulace střevní mikroflóry na mozek je zvýšená exprese proteinu c-Fos.

Z těchto důvodů se má bakalářská práce zabývat vlivem biomodulátoru na expresi c-Fos v mozku myši.

V teoretické části práce je objasněn pojem protoonkogen a protein c-Fos. Dále je poté popisována anatomie mozku myši, dosavadní dostupné informace o ose mikrobiota-střevo-mozek a o nemocech spjatých se změnami střevního mikrobiomu. Na závěr teoretické části je vylíčen námi použitý biologický modulátor, extrakt Juvenil.

V experimentální části bylo pracováno s třemi pokusnými skupinami, k čemuž byly využity myši kmeny Balb/c. První pokusné kontrolní skupině byla po celou dobu měsíčního experimentu podávána pitná kohoutková voda. Druhé pokusné skupině byla po celou dobu experimentu podávána voda obohacená o extrakt Juvenil (1,0 mg/100 ml). A třetí pokusné skupině byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil (1,0 mg/100 ml) sedm dní před ukončením experimentu. K hodnocení byly využity metody semikvantitativního hodnocení obrazu pomocí mikroskopu a také počítačová analýza obrazu, kdy se hodnotila denzita buněk. Všechny výsledky práce jsou diskutovány a shrnuty v závěru bakalářské práce.

2. Cíle práce

1. Studium exprese vybraného protoonkogenu c-Fos jako důležitého markeru neurální aktivity.
2. Potvrzení vědecké hypotézy o zvýšené exprese c-Fos v mozku myši ovlivněných extraktem Juven

3. Teoretická část

3.1 Molekula c-Fos

Gen c-Fos je proto-onkogen, tzn. gen tvořený sekvencemi DNA, které obsahují životně důležité informace pro správné fungování a růst buněk. Proto-onkogen obsahuje informace pro syntézu konkrétního typu proteinu c-Fos, který je poté zodpovědný za buněčný růst, dělení a jiných buněčných procesů. Pokud dojde k mutaci proto-onkogenu, změní se daný gen na onkogen a dojde k nekontrolovatelnému růstu buněk, neboli rakovinnému bujení ([//www.healthline.com/health/proto-oncogene](http://www.healthline.com/health/proto-oncogene)). Gen c-Fos je buněčný homolog onkogenního v-Fos neseného retroviru. Proto-onkogen c-Fos kóduje okamžitý transkripční faktor, který je stimulován přechodně a rychle řadou extracelulárních stimulů jako jsou diferenciace, neurální signalizace a apoptóza. Protein c-Fos, který je kódovaný c-Fos genem, jako další členové skupiny proteinů FOS (jako jsou Fra-1, Fra-2, FosB). Tvoří dimery leucinového zipu s členy skupiny Jun (c-Jun, JunB, JunD) a ATF/CREB, jež poté tvoří komplexy transkripčních faktorů, které jednotně nazýváme AP-1. Protein c-Fos, jako heterodimer AP-1, je hlavním přenašečem krátkodobých podnětů na dlouhodobé odpovědi (krátkodobé extracelulární signály jsou spojeny s dlouhodobými změnami buněčného fenotypu selektivní regulací exprese genu). Protein c-Fos je též aktivátorem fosfolipidové syntézy na cytoplazmatické úrovni při zhoršeném růstu nádorových buněk, při které je potřeba vysoká rychlost biogeneze membrány (Velazquez, et al., 2015; Ordway, et al., 2005).

3.1.1 Vliv c-Fos na vývoj mozku myši

V současné době se protein c-Fos využívá jako marker neurální aktivity, spojuje se jeho funkce s řadou behaviorálních a nervových odpovědí na expresi akutních stimulů (Velazquez, et al., 2015). Dle tohoto výzkumu vyplývá, že c-Fos gen je velmi důležitý při vývoji myšního embrya a pro další vývoj myši. Pouze 40 % myších embryí s *-/-* c-Fos přežívá až do narození a poté narozené myši vykazují zpomalený růst, těžkou osteopetrózu, opožděnou nebo chybějící gametogenezi, změněnou hematopoézu a dožívají se průměrně 6-7 měsíců. Snížená exprese proteinu c-Fos vede též ke změně složení faktorů AP-1, což bývá spojováno se senescencí buněk a předčasnou smrtí myši. Myši c-Fos *-/-* též vykazují poruchu učení, hyperaktivitu či abnormální sexuální chování (Velazquez, et al., 2015). Byla prokázána důležitost c-Fos pro normální diferenciaci kultivovaných krysích buněk PC12 na buňky podobné sympatickým neuronům a pro

regulaci neurální dráždivosti a přežití. U c-Fos *-/-* myších embryí došlo k 20% snížení rychlosti diferenciaci neurálních kmenových progenitorových buněk na buňky neurální, oproti c-Fos *+/+* myším embryím (Velazquez, et al., 2015). Dospělé c-Fos *-/-* myši vykazují snížení tělesné hmotnosti přibližně o 40-60 %. Mozek c-Fos *+/+* myši je ve srovnání s mozkem c-Fos *-/-* myši znatelně větší, což koreluje se sníženým počtem mozkových buněk (Velazquez, et al., 2015).

3.1.2 c-Fos jako marker neurální aktivity

Protein c-Fos se využívá jako funkční marker aktivity v neuronech a neurálních obvodech pro různé druhy stimulů. Funkční gen c-Fos může regulovat neuropeptidy a genovou transkripci. Transkripční funkce c-Fos je rychlou odezvou na stimul, jak pozitivní, tak i negativní. Po stimulaci c-Fos genetické exprese dochází k rychlé indukci v neuronech. K hlavní odezvě v mRNA c-Fos dochází během 30 minut po stimulaci a k vrcholové expresi proteinu c-Fos dochází 60-90 minut po stimulaci. Tento stav přetrvává po dobu 2-5 hodin, díky tomu může být c-Fos protein odečítán i několik hodin po aktivaci exprese a může dojít k identifikaci stimulované oblasti. Jedná se o jaderný protein, který je detekován pomocí markerů lokalizovaných v cytoplazmě pomocí navázání sekundární protilátky (Hoffman, et al., 1993).

3.2 Laboratorní myš, Balb/c

Balb/c myši jsou nejrozšířenějším inbredním kmenem laboratorně využívaných myši (http://www.informatics.jax.org/inbred_strains/mouse/docs/BALB.shtml). Inbrední kmen je nejvýznamnější myší kmen, a to kvůli své přesné genetické definovatelnosti. Balb/c myši se šlechtí procesem inbreedingu, neboli příbuzenského křížení, kdy dochází ke křížení jedinců stejné generace a postupně dochází k narůstání procenta homozygoty (Flachs, 2007). Balb/c kmen se využívá v mnoha různých oborech, nejenom kvůli své genetické stejnorodosti, ale také kvůli své reprodukční životnosti, chovnému výkonu a minimální odchylce hmotnosti mezi samcem a samicí (http://www.informatics.jax.org/inbred_strains/mouse/docs/BALB.shtml). BALB/c myši slouží k produkci hybridomů a monoklonálních látek. Používají se pro výzkum a terapii rakoviny a imunologie, další významné využití je při studiích nedostatku nebo vyřazení genů. U tohoto kmenu myši dochází k nízkému výskytu nádorů mléčné žlázy, ale tyto myši jsou velmi citlivé na karcinogeny. Také lze injekcí minerálního oleje snadno indukovat plasmocytomy v kmenu těchto myši (<https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>). Myši modely využíváme díky rozsáhlé podobnosti

v anatomii, fyziologii a genetice s člověkem. Výzkumné experimenty na myších modelech nám pomáhají vyvozovat závěry v oblasti biologie člověka (Nguyen, et al., 2015).

3.2.1 *Střevní trakt myši*

Střevní trakt myši a člověka jsou si fyziologicky a anatomicky velmi podobné svojí strukturou. Oba gastrointestinální trakty se skládají z orgánů, které jsou si anatomicky podobné, ale musí se vzít v potaz rozdílnost stravovacích návyků, metabolických požadavků a rozdílné velikosti těla jednotlivých druhů. Střevní trakt se jak u myši, tak i u lidí se skládá z dutiny ústní, jícnu, žaludku, tlustého střeva a konečníku. Rozdíl mezi jednotlivými trakty se týká samotné anatomie jednotlivých orgánů, například délkou tlustého střeva, přítomností haustorií v tlustém střevě, rozdílným vstřebáváním některých látek, atd. Tyto rozdíly jsou způsobeny dlouhodobým působením odlišné stravy. I přes značné rozdíly mezi jednotlivými trakty, je myši trakt cenným přínosem pro studia interakce, trakt-mikrobiom (Nguyen, et al., 2015).

3.2.2 *Střevní mikrobiom*

Střevní mikroflóra je velice složitý systém s tisícem mikrobiálních druhů a četnými individuálními variacemi. Střevní mikrobiom ovlivňuje imunitní systém a metabolismus celého těla. Mikrobiom je tvořen řadou mikrobů (bakterií, hub, kvasinek, archeí a virů), které osidlují gastrointestinální trakt a souhrně tyto mikroorganismy nazýváme mikrobiota (Clarke, et al., 2019). K vzájemnému ovlivňování mikrobiot a hostitele dochází prostřednictvím samostatné existence mikrobiomu, jejich metabolickými produkty a bioaktivními molekulami, jejichž produkce je způsobena vzájemnou interakcí. Pokud dojde ke změně složení, tzv. dysbióze střevní mikroflóry, dochází k imunologickým a metabolickým onemocněním jako je například zánětlivé onemocnění střev, diabetes mellitus druhého typu aj. (Wang, et al., 2019). Mikroflóra zdravého dospělého jedince je charakterizována rozmanitostí a stabilitou. Střevní mikroflóra je velice snadno modifikovatelná, jako například užíváním antibiotik, špatnou stravou a dietou, což může vést ke špatným funkcím metabolických drah. Tvorba tohoto holobiontu (organismu a organismy v něm žijící) začíná již při narození, kdy při vaginálním porodu matka předává dítěti řadu bakterií připomínající vaginální mikrobiotu matky (Kubelkova, et al., 2020). Komenzální bakterie kolonizují hostitele krátce po narození a postupně se během růstu hostitele vyvíjí do velmi různorodého ekosystému (Rogier, et al., 2014). Symbiotické bakterie ve střevním traktu člověka metabolizují za normálních podmínek

jinak nestravitelné látky, jako jsou třeba vlákniny, xyloglukany, které se vyskytují v zelenině a trávě je konkrétní druh *Bacteroides* (Larsbrink, et al., 2014). Další nestravitelná vláknina fruktooligosacharidy a oligosacharidy, zpracovávají *Lactobacilly* a *Bifidobacteria* (Goh and Klaenhammer, 2015). Zdravý střevní mikrobiom produkuje denně 50-100 mmol/l mastných kyselin s krátkým řetězcem (např. kyselina octová, propionová či máselná) a tyto mastné kyseliny mohou sloužit jako energie pro střevní epitel hostitelského organismu (Duncan, et al., 2009). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem mohou být rychle absorbovány v tlustém střevě a sloužit při regulaci motility střev, zánětů, homeostázy glukózy a získávání energie (Cani, et al., 2013; Flint, et al., 2012). Střevní mikroorganismy jsou také schopny syntetizovat vitamíny, jako jsou vitamíny K₂, B₇, B₂, B₁₂ a případně i další vitamíny B (Kang, et al., 2012). Vitamín K₂, který je nezbytný pro funkci několika proteinů podílejících se na srážení krve, je také důležitý pro mineralizaci kostí, pro buněčný růst a metabolismus proteinů cévní stěny (<https://www.vyzivaspol.cz/vitamin-k/>). Vitamín B₇, neboli biotin, je důležitý pro řadu metabolických procesů jako je využití tuků, sacharidů a aminokyselin (<https://www.poradnaprozdravi.cz/slovník-pojmu/biotin-vitamin-b7-vitamin-h-detail-1310>). Vitamín B₂, neboli riboflavin, je vitamín, který může být přijímán v potravě nebo syntetizován mikroorganismy je důležitý pro dobrý stav kůže, očí, funkce srdce a dalších orgánů (<https://www.celostnimediceina.cz/riboflavin.htm>). Vitamín B₁₂, jiným názvem kobalamin je důležitý primárně pro správnou funkci krve tvorby, podílí se také na syntéze DNA a ATP a je důležitý pro správnou funkci nervového systému (<https://www.vitalvibe.eu/cs/clanky/246-nejvice-diskutovany-ale-take-podcenovany-vitamin-b12>). Mikrobiom myši a lidí si je velmi podobný. Podobnost sledujeme na úrovni rodů, i s ohledem na rozdílný podíl, a také na úrovni podobné funkčnosti mikrobiomu (Wang, et al., 2019). V posledních desetiletích došlo ke značnému ovlivnění mikrobiomu také kvůli modernímu zpracování potravin, některé změny ve složení střevní mikroflóry jsou spojené s negativním vlivem na organismus jedince, nebo naopak s kladným vlivem na organismus jedince (Kubelkova, et al., 2020).

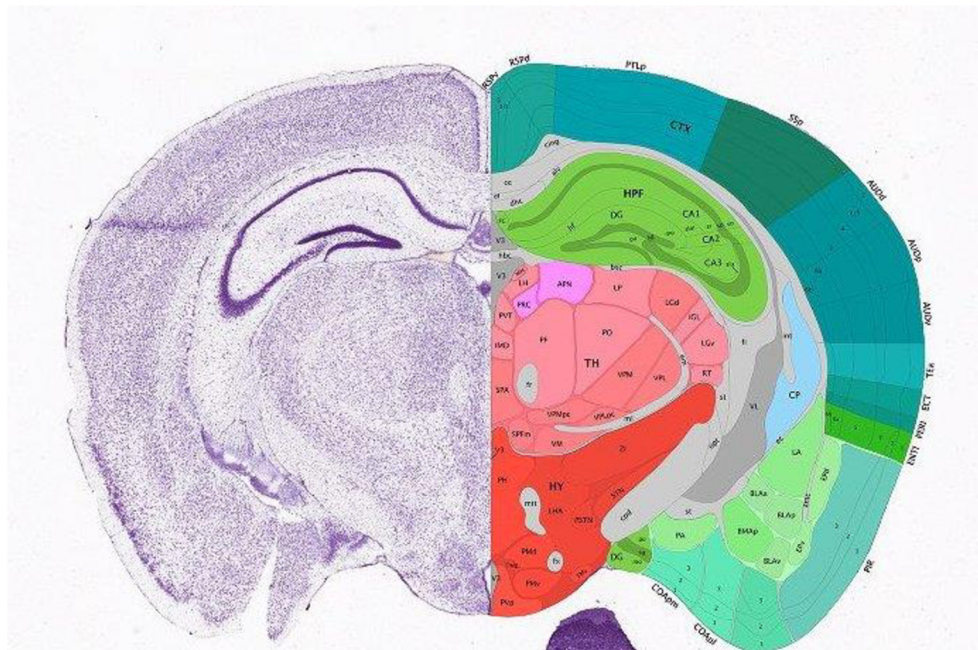
3.3 Mozek myši

Mozek je komplexní orgán sloužící jako řídicí centrum nervové soustavy. Mnoho lidských proteinů je homologických s těmi myšimi, což je využíváno v experimentálním laboratorním prostředí, kdy dochází k pozorování exprese a distribuce proteinů v různých

oblastech a různých buňkách mozku (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/brain/mouse+brain>).

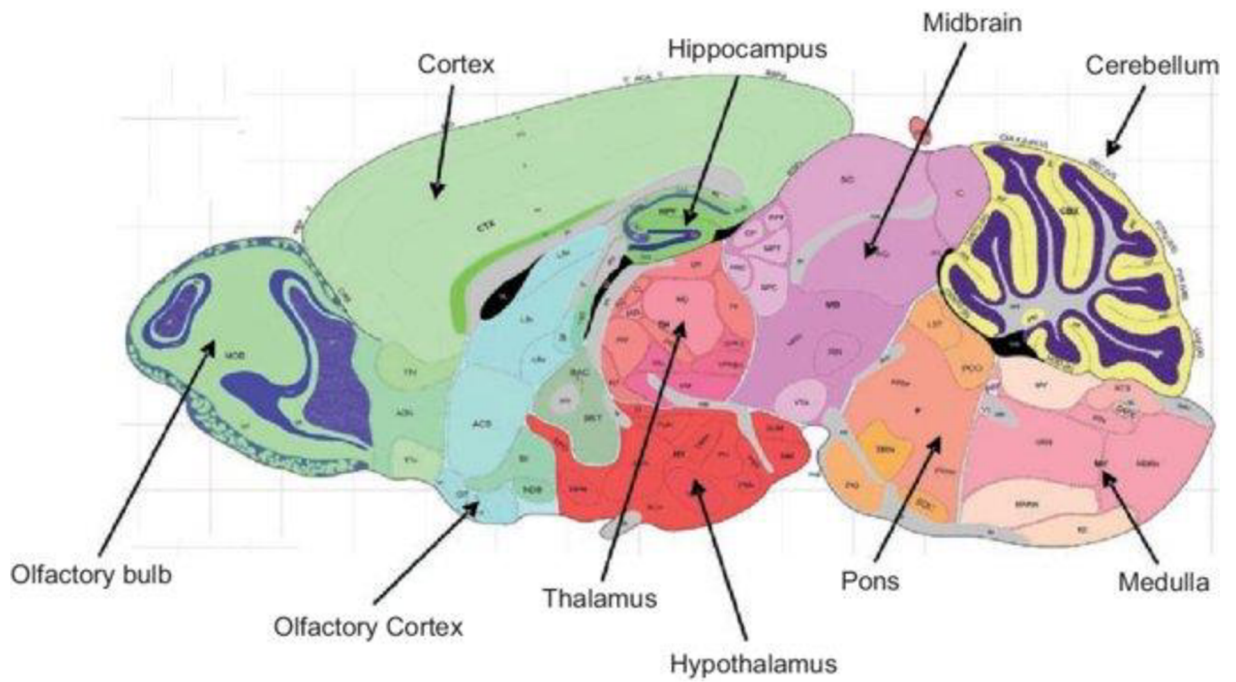
3.3.1 Anatomie mozku myši

Myší mozek je rozdělen do několika oblastí. Tyto oblasti jsou mozková kůra (asociační a analytická oblast, spojuje chování se smyslovou analýzou), výrazná čichová oblast, hipokampus, amygdala, bazální ganglia, thalamus, hypothalamus, střední mozek, mozeček, most Varolův a dřeň (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/brain/mouse+brain>).



Obrázek 1. Anatomický řez mozku myši

(<http://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1&plate=100960092#atlas=1&plate=100960092&resolution=19.25&x=5504.222790948276&y=4191.915051690464&zoom=-4>)



Obrázek 2. Anatomie mozku myši z bočního pohledu

Obrázek přejatý od Heydel, et al., 2010.

3.3.2 *Hipokampus*

Hipokampus je část mozku zprostředkovávající formování a vybavování dlouhodobých vzpomínek. U myši dochází v hipokampu k ukládání informací o prostorové, epizodické a kontextové dimenzi. Hipokampální obvody jsou schopny zpracovávat multisenzorické informační toky a kódovat je do dlouhodobé paměti, díky tomu je organismus schopný rozpoznávat a reagovat na měnící se prostředí (Zemla and Basu, 2017).

3.3.3 *Thalamus*

Thalamus je struktura šedé hmoty diencephalonu nacházející se blízko středu mozku. Thalamus je tvořen řadou jader, které přijímají smyslové a motorické informace ze zbytku těla a vybrané informace poté předávají do mozkové kůry. Thalamus se podílí na regulaci spánku, bdělosti a je zapojen do učení a epizodické paměti (Torricco and Munakomi, 2020).

3.3.4 *Hypothalamus*

Hypothalamus je malá centrální oblast mozku považovaná za spojovací strukturu mezi nervovým a endokrinním systémem. Hlavní funkcí hypothalamu je udržovat homeostázu těla, kontrola vegetativního systému, termoregulace a přizpůsobení emočního chování (Pop, et al, 2017).

3.3.5 *Amygdala*

Amygdala neboli amygdaloidní komplex, je oblast mozku, umístěná v rostrální části temporálního laloku mozku. Amygdala se u lidí i hlodavců skládá z 13 jader. Funkce amygdaly je modulace paměťových procesů, spojených s emočním prožíváním. Amygdala je také spojována s neurálními systémy, které jsou základem normálního sociálního chování a s emočním chováním, zejména strachem, stresem a úzkostí (Chareyron, et al., 2015).

3.3.6 *Piriformní kůra*

Piriformní kůra (piriformní cortex), je největší část mozku funkčně specializovaná na příjem čichových vjemů, kde dochází ke zpracování čichových informací vyššího řádu. Piriformní kůra má vysoce autoasociativní architekturu s rozsáhlou sítí vzájemného vnitřního propojení a propojení s různými podoblastmi. Piriformní kůra je významnou součástí mozku hlodavců, tvořenou třívrstevným paleokortexem (Illig and Wilson, 2009).

3.3.7 *Mozková kůra*

Mozková kůra (cerebral cortex) je vnější obal nad hemisférami tvořená šedou hmotou. Oblasti mozkové kůry, které mají jednodušší funkce, jsou nazývány primární kůrou a patří sem oblasti přijímající smyslové vjemy jako je zrak, sluch a somatické vjemy a oblasti přímo zapojené do produkce pohybů končetin nebo očí. Asociační kůra zajišťuje složitější funkce (https://www.dartmouth.edu/~rswenson/NeuroSci/chapter_11.html).

3.4 *Osa mikrobiota-střevo-mozek*

Jedná se o oboustranné ovlivňování mezi mozkem a střevem. Výzkumu vlivu střevní mikroflóry na mozek a studiu vlivu mozku na střevní mikroflóru je dlouhodobě věnována zvýšená pozornost, kvůli zvyšujícímu se emocionálnímu a psychosociálnímu tlaku na jedince, kteří častěji trpí na problémy týkající se gastrointestinálního traktu. Tito jedinci více trpí příznaky jako je pálení žáhy, poruchy trávení, nadýmání, zácpa, bolest břicha a jiné (Kubelková and Marcela, 2020). Během života je střevní mikrobiom ovlivňován

životním stylem, mírou cvičení, stravou, stresem, užíváním antibiotik a jiných léků. Strava a různé druhy diet hrají velkou roli ve složení střevního mikrobiomu, změnou stravy dochází ke změnám mikrobiálního profilu. Zdravé stravování má příznivé účinky na organismus, zatímco nezdravé stravování a diety jsou spojovány s řadou metabolických syndromů (Long-Smith, et al., 2020). Ke komunikaci v ose mikrobiota - střevo - mozek dochází dvěma nezávislými cestami. První cesta je může být viditelná u defektů epiteliálních bariér hostitele. Střevo poskytuje imunitní odpovědi při vstupu patogenů do organismu. Tuto imunitní odpověď zprostředkovávají specializované lymfoidní tkáně, jako jsou Peyerovy náplasti a mezenterické lymfatické uzliny. Místa pro obrannou odpověď jsou slizniční epitel a podkladová lamina propria (<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/organs-and-tissues/immunity-in-the-gut>). V těchto oblastech se nachází mnoho imunitních buněk jako jsou aktivované T buňky, neutrofilů (jako první reagují na porušení intestinální epitelární bariéry), vrozené lymfoidní buňky a makrofágy. Složením střevní mikroflóry může být ovlivněna produkce pro- a protizánětlivých cytokinů jako jsou TNF- α , IL-1 β a IL-6, které prodlužují životnost neutrofilů, poté podílejí na protizánětlivé odpovědi střeva prostřednictvím fagocytózy. TNF- α , IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17, IL-22 cytokiny jsou produkovány lymfoidními buňkami a odpovídají na různé imunitní odpovědi a tyto cytokiny jsou poté schopny mozku signalizovat pomocí oběhového systému (Xue and Falcon, 2019). Druhá cesta je zajištěna neurálním spojením mozku a střeva. Lumen střeva obsahuje velké množství molekul, z nichž je část významná svou biologickou aktivitou. Mezi těmito molekulami se též nachází složky výživy, signální molekuly z buněk střeva, mikrobiální metabolity nebo hormony produkovány endokrinními žlázami. Tyto různé chemické složky jsou signálního charakteru, což znamená, že mohou za určitých podmínek, jako je například dlouhodobý stres, překračovat intestinální epiteliální bariéru, a díky tomu jsou schopné se translokovat do mozku a aktivovat specifické receptory, které poté mohou ovlivňovat chování mozku. Nervus vagus je jedním z klíčových způsobů komunikace mezi střevem a mozkem, kdy glutamát uvolňovaný z endokrinních buněk může aktivovat vagální aferenty. V rámci onemocnění, jako je Alzheimerova porucha, deprese, autismus nebo posttraumatická porucha, byly pozorovány rozdíly ve složení střevního mikrobiomu oproti klinickým modelům (Kubelková and Marcela, 2020; Long-Smith, et al., 2020).

3.4.1 *Terapeutické využití osy mikrobiom-střevo-mozek*

S nově se objevujícími poznatky o vlivu střevní mikroflóry na mozek, zdraví a psychickou pohodu organismu, se objevují modulátory zprostředkovávající příznivý účinek na mozek. Psychobiotika jsou doplňky stravy, které mají vliv na mozek, zprostředkovaně pomocí bakterií. Psychobiotika jsou tedy látky, které ovlivňují signalizaci osy mikrobiom-střevo-mozek, včetně probiotik, prebiotik, synbiotik (kombinace probiotik a prebiotik) a postbiotik (jsou to metabolity bakteriální fermentace zahrnující bioaktivní látky). Tyto látky lze do organismu dostávat pomocí doplňků stravy, funkčních potravin a zlepšením stravovacích návyků (Long-Smith, et al., 2020).

3.4.2 *Onemocnění spojené se změnami střevního mikrobiomu*

Symbioticky je s člověkem spojeno více než 100 bilionů mikroorganismů. Tyto mikroorganismy jsou s člověkem spojeny symbioticky i uvnitř těla a hrají zásadní roli v ovlivňování lidského zdraví (O'Hara and Shanahan, 2006). Lidský střevní mikrobiom obsahuje přibližně 150krát více genů, než obsahuje celý lidský genom (Ursell, et al., 2014). V posledních době se více začíná studovat, jakou roli hraje střevní mikroflóra v lidském zdraví a jaký vliv má na nemoci. Mikrobiota mohou zvyšovat vstřebávání energie z potravy, zvýšit vstřebávání živin a změnit signalizaci chuti k jídlu. Střevní mikrobiota také poskytují fyzickou bariéru, kdy chrání člověka před cizorodými patogeny. Střevní mikrobiom je tedy nezbytný pro správný vývoj imunitního systému a vstřebávání živin. S lidskou mikroflórou jsou také spojována některá chronická onemocnění, jako je obezita, zánětlivé onemocnění střev, diabetes mellitus, metabolický syndrom, ateroskleróza, alkoholické onemocnění jater, nealkoholické tukové onemocnění jater, cirhóza nebo hepatocelulární karcinom (Ley, et al., 2006; Wang, et al., 2016). Porucha střevní mikroflóry je také spojena s progresí viru HIV (Cohen, 2016; Ling, et al., 2016) nebo viru hepatitidy (Xu M., 2012). Studie srovnávající myší model s normálním mikrobiomem a myší model bez mikroorganismů (germ-free) ukázala rozsáhlé defekty ve vývoji lymfoidní tkáně spojené s trávením a produkcí protilátek (Round, et al., 2009; Madsen, et al., 1999).

3.4.3 *Infekce *Clostridium difficile**

Bakterie *Clostridium difficile* je anaerobní grampozitivní bacil tvořící spory. Jedná se o bakterii, která je součástí střevní sliznice. Při užívání antibiotik dochází k narušení homeostázy střevní sliznice a snižuje se tedy odolnost proti toxinu produkující *Clostridium difficile*. Tento patologický stav obvykle souvisí s průjmami (Gu, et al., 2016).

3.4.4 *Infekce HIV*

Střevní mikrobiom u lidí nakažených HIV virem je narušen a dochází k významnému zvýšení poměru *Firmicutes/Bacteroidetes*. I po krátkodobé účinné léčbě pomocí antiretrovirové terapie je stále fekální mikroflóra v dysbióze a není zcela obnovena (Ling, et al., 2016).

3.4.5 *Střevní mikrobiom a onemocnění jater*

Mezi játry a střevním traktem dochází k interakci. Játra jsou neustále vystavena faktorům odvozeným ze střeva, včetně bakterií a bakteriálních složek, proto se začal používat pojem osa střevo-játra (Gianneli, et al., 2014). Střevní mikrobiota produkují etanol, amoniak a acetaldehyd a tyto látky mohou později ovlivňovat metabolismus jater nebo funkci jater pomocí uvolňování endotoxinů (Nardone and Rocco, 2004).

3.4.6 *Kolorektální karcinom*

V dnešní době dochází k mnoha výzkumům studujících vztah střevní mikroflóry a karcinomu tlustého střeva. Patologická dysbióza ve střevním traktu byla pozorována u subjektů s adenomy oproti zdravým kontrolám (Sanapareddy, et al., 2012; Castellarin, et al., 2012). Zackular a kolektiv (2013) zjistili, že střevní mikrobiom myši s nádory podporuje u zvířat příjemců zánět a karcinogenezi, čímž dochází k podpoře kolorektálního karcinomu. Není přesto jasné, zda tyto vztahy fungují i u lidí a zda změna ve střevní mikroflóře podněcuje vznik tumoru nebo zda je tato změna ve střevním mikrobiomu pouze důsledkem adenomů a kolorektálního karcinomu (Zackular, et al., 2013).

3.4.7 *Střevní mikrobiom a metabolické poruchy*

Dysbióza střevní mikroflóry ovlivňuje produkci imunitních mediátorů a vyvolává tak chronický zánět a poruchy metabolismu. Tato střevní nerovnováha bývá způsobována užíváním antibiotik a nezdravým životním stylem (Sommer and Bäckhed, 2013).

3.4.8 *Obezita*

Studie Ridaura a kolektivu (2013) ukazuje, že mikrobiota z hubených nebo obézních dvojčat indukuje u myši podobnou adipozitu a metabolické fenotypy. Mikrobiota od hubeného dvojčete může zabránit nárůstu adipozity u obézních myší, pokud jsou krmeny vhodnou stravou (Ridaura, et al., 2013). Z těchto studií lze tedy vyvodit důležitost střevního mikrobiomu v metabolických procesech.

3.4.9 *Diabetes mellitus druhého typu*

Diabetes mellitus je metabolická porucha, kdy organismus není schopen zpracovávat glukózu za fyziologických podmínek v důsledku relativního nebo absolutního nedostatku inzulínu a při současné periferní inzulínové rezistenci (<https://www.cukrovka.cz/cukrovka-typu-2-2>). Mnoho studií naznačuje spojitost mezi diabetem a nižší rozmanitostí a odolností střevního mikrobiomu. Mechanismy způsobující toto onemocnění mohou souviset s translokací mikrobiomu ze střev do tkání, což poté vyvolává vznik zánětu (Burcelin, 2016). Pedersen a kolektiv (2016) potvrdili, že střevní mikrobiom může, pomocí druhů jako je *Prevotella copri* a *Bacteroides vulgates*, podnítit rezistenci na inzulín a ovlivnit tak sérový metabolom, který představuje globální soubor všech nízkomolekulárních metabolitů, které jsou produkovány buňkami během metabolismu, a poskytovat tak přímé funkční odezvy buněčné aktivity a fyziologického stavu (<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/metabolome>; Forslund, et al., 2015).

3.4.10 *Střevní mikrobiom a alergická onemocnění*

Náchylnost k alergickému astmatu může být způsobena nízkou diverzitou střevního mikrobiomu v raném věku dítěte (Russell, et al., 2012). Způsob porodu a kojenecké výživy může působit na složení střevní mikroflóry a následně tak ovlivňovat riziko atopických projevů (van Nimwegen, et al., 2011). Střevní mikrobiota interaguje s imunitním systémem a poskytuje mu signály pro podporu zrání regulačních T buněk a regulačních buněk prezentujících antigen, tyto buňky poté mají zásadní funkci ve vývoji imunologické tolerance (Atarashi, et al., 2011).

3.4.11 *Střevní mikrobiom a psychická onemocnění*

Existence osy střevo-mozek je uznávána po celá desetiletí. Tato osa hraje důležitou roli pro udržení normální funkce gastrointestinálního traktu a mozku. Koncept této osy se rozšířil na osu mikrobiota-střevo-mozek a dnes již víme, že zahrnuje řadu systémů jako je endokrinní systém, nervový systém, imunitní a metabolický systém. Tyto systémy jsou spolu v neustálé interakci (Cryan and Dinan, 2012). Porucha autistického spektra koreluje se změnou střevního mikrobiomu a relativně nízkým výskytem mukolytických bakterií *Akketmansia muciniphila* a *Bifidobacterium* ve výkalech autistických dětí (Wang, et al., 2011). Při studiích depresivních poruch byly objeveny zvýšené hladiny *Enterobacteriaceae* a *Alistipes* a snížené hladiny *Faecalibacterium* (Jiang, et al., 2015).

3.5 Extrakt Juvenil

Extrakt Juvenil je tkáňový extrakt, využívající se jako doplněk stravy. Tkáňové extrakty jsou získávány extrakcí z tkání nebo orgánů zvířat. Výrobky s extraktem Juvenil jsou prodávány jako doplňky stravy na podporu buněčné imunity, energie, regeneraci tkání, hojení ran, ale také na zlepšení funkce endokrinních žláz, integritu intestinálního traktu, zlepšení paměti a pro své možné protinádorové účinky. Extrakt Juvenil byl vyvinut předními českými imunology a poprvé byl distribuován z České republiky v 50. letech minulého století (historicky označen různými názvy). Extrakt Juvenil byl testován v několika klinických studiích a všechna shromážděná data prokazují neškodnost tohoto extraktu. Extrakt Juvenil není tedy genotoxický, není mitogenní a neobjevují se žádné vedlejší účinky, naopak byl prokázán pozitivní přínos pro organismus jedince. Přesto se stále vedou diskuse o vlastním biologickém působení tohoto preparátu (Kubelková and Marcela, 2019; Kubelkova, et al., 2020).

3.5.1 Výroba extraktu Juvenil

Extrakt Juvenil se získává nedestruktivní alkohol-éterovou extrakcí hovězí krve. Děje se tak moderním biotechnologickým procesem založeným na autoenzymatické dezintegraci makromolekulární proteinové složky. Produkt podléhá dlouhodobé nedestruktivní extrakci s následnou přirozenou separací sady účinných nízkomolekulárních látek, které mají katalytický účinek na specifické žlázy vnitřní sekrece a příznivě ovlivňují intermediální metabolismus buňky. To umožňuje využít podstatnou dávku kvantitativní sady aminokyselin a esenciálních aminokyselin spolu s nízkomolekulárními peptidy a oligopeptidy navázanými na dezintegrační produkty a působí také na obnovu imunitního systému a na buněčné procesy (<https://www.healthylifegen.com/IngredientsList.html>).

3.5.2 Využití extraktu Juvenil

Produkty s extraktem Juvenil se užívají jako prevence civilizačních onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, astma a alergická onemocnění. Extrakt Juvenil je zdrojem esenciálních aminokyselin, které jsou základní stavební jednotkou pro proteiny, nutné k ochraně a regeneraci tkání lidského těla. Nukleotidy mají také pozitivní vliv na metabolické fungování a absorpci železa, snižování množství LDL cholesterolu a tím i pozitivní vliv na prevenci kardiovaskulárního onemocnění. Extrakt Juvenil zlepšuje průběh a snižuje četnost projevů alergických onemocnění a také běžných onemocnění jako je chřipka, angína, nachlazení a jiné. Extrakt Juvenil vykazuje

pozitivní působení na hojení ran, díky svému obsahu nukleotidů, které jsou důležité pro tvorbu proteinů, jež jsou potřebné pro regeneraci (Richter, et al., 1996). Produkt Juvenil obsahuje také organickou kyselinu taurin, která se v nízkých koncentracích objevuje v plazmě a tkáních většiny savců. Taurin funguje jako modulátor biologických změn v mozku a tím způsobuje velké množství následných změn v orgánovém systému člověka (Kubelková, et. al., 2021).

3.5.3 Studie protinádorových účinků Juvenilu

Dlouhodobě probíhají různé studie vlivu extraktu Juvenilu na léčení rakoviny různými vědeckými skupinami. Výskyt maligních tumorů se zvyšuje, např. v České republice, kde se od roku 1980 do roku 2015 výskyt maligních tumorů zdvojnásobil. Nicméně úmrtnost na maligní nádory vykazuje dlouhodobý pokles (<https://www.uzis.cz/index.php?pg=vystupy--tematicke-rady>). Důvody nižší úmrtnosti na maligní nádory je zlepšení zdravotní péče včetně dostupnosti nových diagnostických přístrojů a léčebných látek (Dominguez-Brauer., et al., 2015). Jednou z metod léčby rakoviny a modulování biologických reakcí organismu, je využívání živočišných nebo rostlinných extraktů z tkání (Norton., et al., 2000). Přípravky připravené z rostlinných nebo živočišných tkání jsou využívány jako doplňky stravy díky svému obsahu zdraví prospěšných látek, které jsou farmakologicky a/nebo fyziologicky aktivní. Jako doplněk stravy mohou být využity jejich izolované složky nebo v podobě konkrétních léků (Dušková, et. al., 2019). Kolektiv Dušková et al. (2019), studovali vliv alkoholových extraktů z hovězí tkáně na nádorové bujení. Data dále ukazují na přímý protinádorový účinek různých RTN přípravků při jejich injekci pacientům v terminálním stádiu rakoviny (Doležal, et al., 1954). Dušková a kolektiv (2019) provedli experiment, ve kterém testovali protinádorový účinek přípravku Juvenil. Jako experimentální cíl byla zvolena linie nádorových buněk H1299 a NHLF (obě linie jsou radiorezistentní vůči 2 a 4 Gy záření gama). Z obecných údajů lze vyvodit, že alkoholový extrakt z hovězí tkáně přidaný do směsi neozářené lidské buněčné kultury v nejvyšší dávce (10,0 µg/mL) má významný cytostatický a cytotoxický účinek. Zatímco neozářené nádorové buňky při stejné dávce extraktu nevykazovali odezvu. Cytostatický a cytotoxický účinek extraktu Juvenilu je významný po 24 hodinách buněčné kultivace s extraktem. Data tedy ukazují, že funkce Juvenilu není specificky cytotoxický, ale spíše dočasně blokuje buněčný cyklus v určité fázi. Experiment také ukázal, že při ozařování jsou díky extraktu Juvenil nenádorové buňky ozařováním ovlivněny méně než buňky nádorové. Pokud dojde

k potvrzení těchto účinku *in vivo* na nenádorové buňky, může být Juvenil dále využíván při pomocné léčbě rakoviny, kdy může nahradit v mnoha případech také použití radioterapie (Dušková, et al., 2019).

3.5.4 Nukleotidy

Nukleotidy jsou jednou ze složek extraktu Juvenilu (Kubelková, et al., 2021). Nukleotidy jsou fosforečné estery pentóz (ribózy a deoxyribózy) vázané na šestičlennou pyrimidinovou (cytozin, thymin, uracil) nebo pětičlennou purinovou bázi (adenin, guanin, xantin, hypoxantin). Nukleotidy jsou schopny vázat jednu, dvě nebo tři molekuly kyseliny fosforečné, tzv. fosfátu (van Buren, Rudolph, 1997). Tvorbou těchto vysokoenergetických anhydridových vazeb, vznikají nukleosid-difosfáty a nukleotid-trifosfáty, jež jsou vysokoenergetické makroergní sloučeniny. Nukleotidy jsou také prekurzory nukleových kyselin DNA a RNA. Nukleotidy se díky ionizaci fosfátové skupiny chovají jako středně silné kyseliny. Purinové a pyrimidinové trifosfáty jsou schopny efektivně transportovat chemickou skupinu, fungují tedy v energetickém metabolismu organismů jako donory fosfátu. Monofosfáty, difosfáty a trifosfáty se účastní všech metabolických funkcí v organismu. Nejvíce univerzální nukleotid je ATP. ATP je donor volné energie pro řadu biologických reakcí. ATP spolu s dalším adeninovým nukleotidem je součástí hlavního koenzymu, jako je cyklický derivát ATP cAMP, který je hlavním ústředním regulačním faktorem metabolismu. Nukleotidy jsou také díky svým konjugovaným vazbám v purinových a pyrimidinových skupinách vázány UV záření o vlnové délce 260 nm, které má mutagenní vlastnosti. Nukleotidy jsou nepostradatelné také při regeneraci (Rodwell, 1993). Regenerace je proces obnovy tkání, tento proces probíhá ve všech tkáních těla, na jednu mitózu je potřeba přibližně 10^9 nukleotidů. (Roux, 1973). Nukleotidy mohou být syntetizovány endogenně, ale jejich endogenní syntéza nemusí být vždy dostatečná a je proto potřeba doplňovat nukleotidy ze stravy. Potraviny bohaté na nukleotidy jsou např. maso a luštěniny. Při růstu, rekonvalescenci po operaci nebo nehodě, při zvýšené zátěži organismu tělo potřebuje větší množství nukleotidů, a tedy je potřeba přijímat vyšší množství nukleotidů potravou nebo doplňky stravy. K hydrolyze nukleotidů dochází již částečně v žaludku. Ve střevě poté dochází ke štěpování nukleové kyseliny pomocí proteolytických enzymů. Takto odštěpené nukleové kyseliny jsou dále rozkládány na polynukleotidy až mononukleotidy pankreatickými nukleázami a střevními polynukleotidázami a fosfoesterázami. Takto rozštěpené poly- až mononukleotidy jsou alkalickou fosfatázou enterocytu hydrolyzovány na nukleosidy

(Quan, et al., 1990) (glykosylaminy složené z nukleové báze, sacharidu a deoxyribózy nebo ribózy) a degradovány na purinové a pyrimidinové báze (Cory, 1992).

4. Praktická část

4.1 Materiál a metodika

4.1.1 Seznam použitých chemikálií

anestetikum

biotinylovaná sekundární protikráličí protilátka (Dako REAL™ Link kit; Ybux, Brno, Česká republika)

deionizovaná voda, přístroj Aqual 29 (Aqual s.r.o., Lelekovice, Česká republika)

3,3'-diaminobenzidu (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika)

etylglykol (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)

extrakt Juvenil (Juvenil Products a.s., Přezletice, Česká republika)

citrátový pufr

formalín (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika)

fosfátový pufr (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)

hematoxylin (Merck, Kenilworth, New Jersey, USA)

histoalkohol 99 (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika)

jodičnan draselný (Lachema, Brno, Česká republika)

kohoutková voda

komplex streptavidinu s křenovou peroxidázou (AB2; součást Dako REAL™ Link kitu, Brno, Česká republika)

kyselý alkohol (200 ml 99% histoalkoholu a 7,5 ml 37% HCl [Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika])

kyselina octová (Penta, Praha, Česká republika)

montovací médium DPX histomount (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)

peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)

polyklonální králičí protilátka detekující c-Fos (ThermoFisher Scientific, Praha, Česká republika)

síran hlinitý (Lachema, Brno, Česká republika)

tekutý paraplast (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)

xylen (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika)

1% vodném roztoku eozinu (Merck, Praha, Česká republika)

želatina (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika)

4.1.2 *Pokusná zvířata*

K experimentu bylo použito 13 myši kmene Balb/c dodaných firmou Velaz s.r.o (Útěnice, Česká republika). 13 myši bylo rozděleno do 3 skupin (klecí).

4.1.3 *Experimentální skupiny*

První kontrolní skupině (5 ks myši) byla po dobu 30 dní podávána kohoutková pitná voda bez obsahu účinných látek (skupina označena jako kontrola). Druhé skupině (5 ks myši) byla do dobu 30 dní podávána voda obohacená o extrakt Juvenilu (1,0 mg/100 ml) (skupina označená jako IMU). Třetí skupině (3 ks myši) byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenilu pouze posledních 7 dní před ukončením experimentu (skupina označená jako IMU/7). Třicátý den od počátku pitného režimu byla provedena eutanazie pokusných zvířat předávkováním anestetikem. Myšim byl poté odpreparován a odebrán mozek pro histologickou a imunohistologickou analýzu. Laboratorní zvířata byla ustájena v klimatizované místnosti (22 ± 2 °C, $50 \pm 10\%$ relativní vlhkost, světlo od 07:00 do 19:00 hodin). Zvířata byla ustájena na dobu minimálně 3 týdnů před započítím experimentu. Práce se zvířaty byla schválena etickou komisí FVZ UO (Hradec Králové, Česká republika) a probíhala podle platné české a evropské legislativy pro práci s laboratorními zvířaty.

4.1.4 *Histologické vyšetření*

Bezprostředně po odběru byl mozek fixován v 10% roztoku formalínu (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika). Vzorky byly následně ponechány v roztoku formalínu po dobu jednoho měsíce. Po fixaci byly vzorky zakrojeny pomocí skalpelu v místě odpovídající přibližně -3 mm od bregmatu (bregma je název místa na lebce, kde se stýká šípový a věnčitý šev) (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition, Paxinos and Watson, 2006).

4.1.5 *Zhotovení preparátů*

4.1.6 *Odvodnění preparátů a zalití do parafínu*

Z fixovaného mozku byl nejprve vymyt formalín pod tekoucí vodou po dobu jedné hodiny. Poté následovalo odvodnění pomocí vzestupné alkoholové řady připravené z histoalkoholu 99 (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika) a xylenu (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika) a ponoření vzorků do tekutého paraplastu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v tkáňovém procesoru Leica TP1020 (Leica, Wetzlar, Německo). Koncentrace etanolu a doba setrvání vzorku v jednotlivých fázích je znázorněna v Tabulce 1. Vzorky takto zbavené vody byly pomocí tekutého paraplastu (56 °C; Biologický termostat BT 120, Sedlec-Prčice, Československo) zality do bločků a ponechány ztuhnout při -20 °C. Zmražené vzorky byly krájeny pomocí mikrotomu SM 2000 R (Leica, Wetzlar, Německo). Z každého bločku byly odkrojeny dva řezy o tloušťce 5 µm.

Tabulka 1. Odvodnění tkáňových vzorků v lázních vzestupné řady etanolu, xylenu a parafínu

pořadí	Prostředek	Délka působení
1	70% etanol	1 hodina
2	70% etanol	1 hodina
3	80% etanol	2 hodiny
4	90% etanol	1 hodina
5	95% etanol	1 hodina
6	95% etanol	1,5 hodiny
7	99% etanol	3 hodiny
8	xylén	1,5 hodiny
9	xylén	1,5 hodiny
10	xylén	1,5 hodiny
11	parafín	4 hodiny
12	parafín	5 hodin

4.1.7 *Natažení řezů na podložní skla*

Připravené řezy byly přeneseny na etanolem odmaštěná podložní sklíčka (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika) a podlity 0,5% roztokem želatiny (Bamed

s.r.o., České Budějovice, Česká republika). Preparáty byly umístěny na vyhřátou (37° až 40 °C) topnou desku BMD 2 (Bičels s.r.o., Hradec Králové, Česká republika), čímž došlo k natažení řezu. Nadbytečná želatiny byla slita a ponechána, aby odkapala. Následně byly preparáty umístěny do termostatu Memmert BE 500 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo) a při 37 °C se byla odpařena přebytečná voda.

4.1.8 Odparafinování preparátů

Z řezů natažených na podložní sklička byl odstraněn parafin pomocí procesu odparafinování. Skla byla postupně umístěna do lázní xylenu, sestupné alkoholové řady připravené z histoalkoholu 99 a deionizované vody, doba setrvání vzorků mozku v jednotlivých lázních je znázorněna v Tabulce 2. Deionizovaná voda byla vyrobena pomocí přístroje Aqual 29 (Aqual s.r.o., Lelekovice, Česká republika). Takto odparafinované vzorky byly připraveny na další barvení.

Tabulka 2. Odparafinování v xylenových a etanolových lázních a deionizované vodě

pořadí	prostředek	délka působení
1	xylén	10 minut
2	xylén	10 minut
3	xylén	10 minut
4	etanol 96%	10 minut
5	etanol 96%	10 minut
6	etanol 70%	10 minut
7	deionizovaná voda	5 minut

4.1.9 Barvení hematoxylinem a eozinem

Pro hematoxylinové-eozinové barvení bylo potřeba nejprve připravit roztok Gillova hematoxylinu. Za stálého míchání byl nejprve v deionizované vodě za stálého míchání rozpuštěn hematoxylin (Merck, Kenilworth, New Jersey, USA), jodičnan draselný (Lachema, Brno, Česká republika) a síran hlinitý (Lachema, Brno, Česká republika). Poté se k nim byl za stálého míchání přidán etylenglykol (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a jako poslední 100% ledová kyselina octová (Penta, Praha, Česká republika). Přesná množství látek nezbytných pro výrobu Gillova hematoxylinu jsou uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3. Složení roztoku Gillova hematoxylinu

látka	Hmotnost/objem jednotlivých položek
hematoxylin	4 g
KIO ₃	0,4 g
Al ₂ (SO ₄) ₃	35,2 g
deionizovaná voda	710 ml
etylenglykol	250 ml
CH ₃ COOH	40 ml

V roztoku Gillova hematoxylinu byly preparáty barveny po dobu 3 minut. Poté byly opláchnuty deionizovanou vodou, na několik vteřin vloženy do 70% histoalkoholu a diferencovány v kyselém alkoholu (200 ml 99% histoalkoholu a 7,5 ml 37% HCl [Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika]). Jako poslední proběhl oplach deionizovanou vodou, aby došlo k zabarvení vzorků do modra. Sklíčka poté byla omyta pod tekoucí kohoutkovou vodou a následně opět vložena do deionizované vody. Celý postup je popsán v Tabulce 4.

Tabulka 4. Postup diferenciaci a oplachu preparátů

Pořadí	Lázeň	Doba lázně
1	70% histoalkohol	5 sekund
2	kyselý alkohol	5 sekund
3	pramenitá voda	20 minut
4	deionizovaná voda	1 minut

Preparáty byly nakonec dobarveny v 1% vodném roztoku eozinu (Merck, Praha, Česká republika), opláchnuty v deionizované vodě a promyty ve vzestupné alkoholové řadě, acetonu a xylenu tak, jak je znázorněno v Tabulce 5.

Tabulka 5. Barvení preparátů eozinem a následné odvodňování

Pořadí	Lázeň	Doba lázně
1	eozin 1%	1 minuta
2	deionizovaná voda	oplach
3	etanol 70%	2 minuty
4	etanol 80%	2 minuty
5	etanol 96%	2 minuty
6	aceton	2 minuty
7	xylén	5 minuty
8	xylén	5 minut
9	xylén	5 minut

4.1.10 *Fixace vzorků do bezvodého média*

Jako poslední krok byly preparáty zamontovány do montovacího média DPX histomount (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika). Na odvodněné vzorky se pomocí kapátka nakapalo se montovací médium a poté se opatrně, aby nevznikla bublina, přiložilo krycí sklíčko (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika). Hotové preparáty se umístily do termostatu, aby montovací médium zaschlo.

4.1.11 *Histochemické barvení c-Fos*

Po odparafinování, dle Tabulky 2, byly nejprve pomocí mikrovlnné trouby odmaskovány antigeny. Tento proces probíhal 2krát po dobu 5 minut při příkonu 750 wattů. V průběhu procesu byly vzorky ponořeny v citrátovém pufru. Složení citrátového pufru udává Tabulka 6.

Tabulka 6. Roztok citrátového cyklu

látka	objem
0,1M kyselina citrónová	9 ml
0,1M citrát sodný	41 ml
destilovaná voda	500 ml

Výsledné pH pufru je rovno 6,0

Poté byly preparáty, k deaktivity endogenní peroxidázy, přeneseny do tlumícího roztoku peroxidu vodíku v metanolu, který na tkáň působil 20 minut při pokojové teplotě. Postup je ukázán v Tabulce 7

Tabulka 7. Tlumící roztok

látka	objem
30% peroxid vodíku	1,8 ml
metanol	100 ml

Následně byly preparáty ponořeny na 5 minut do lázně z destilované vody. K zabránění nespecifických vazebných interakcí byl při pokojové teplotě na 30 minut nanesen roztok kravského albuminu ve fosfátovém pufru. Fosfátový pufr byl připraven pomocí tablet fosfátového pufru (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) rozpuštěných v deionizované vodě dle návodu výrobce, tento postup je popsán v Tabulce 8.

Tabulka 8. Roztok kravského albuminu

látka	objem/hmotnost
sušené odtučněné mléko	1 g
fosfátový pufr pH 7,2	20 ml

Po uplynutí daného časového intervalu byla pro detekci c-Fos použita polyklonální králičí anti-myší protilátka detekující c-Fos (ThermoFisher Scientific, Praha, Česká republika) ředěná ve fosfátovém pufru v poměru 1:500. Následoval oplach ve fosfátovém pufru k odstranění nenavázané primární protilátky. V dalším kroku byla na preparát nanášena biotinylovaná sekundární protilátka (Dako REAL™ Link kit; Ybux, Brno, Česká republika) a inkubována po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě ve vlhké komůrce (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika) zabraňující vysušení preparátu. Vzorek byl poté propláchnut ve fosfátovém pufru k odstranění nenavázané sekundární protilátky. V dalším kroku byl nanesen komplex biotin-streptavidinu s křenovou peroxidázou (AB2; součást Dako REAL™ Link kitu, Brno, Česká republika). Tento komplex se váže na biotin při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Nenavázaný komplex byl omyt fosfátovým pufrům stejně jako primární a sekundární protilátka. K detekci aktivity peroxidázy a vzniku barevné reakce byl 20 minut při pokojové teplotě

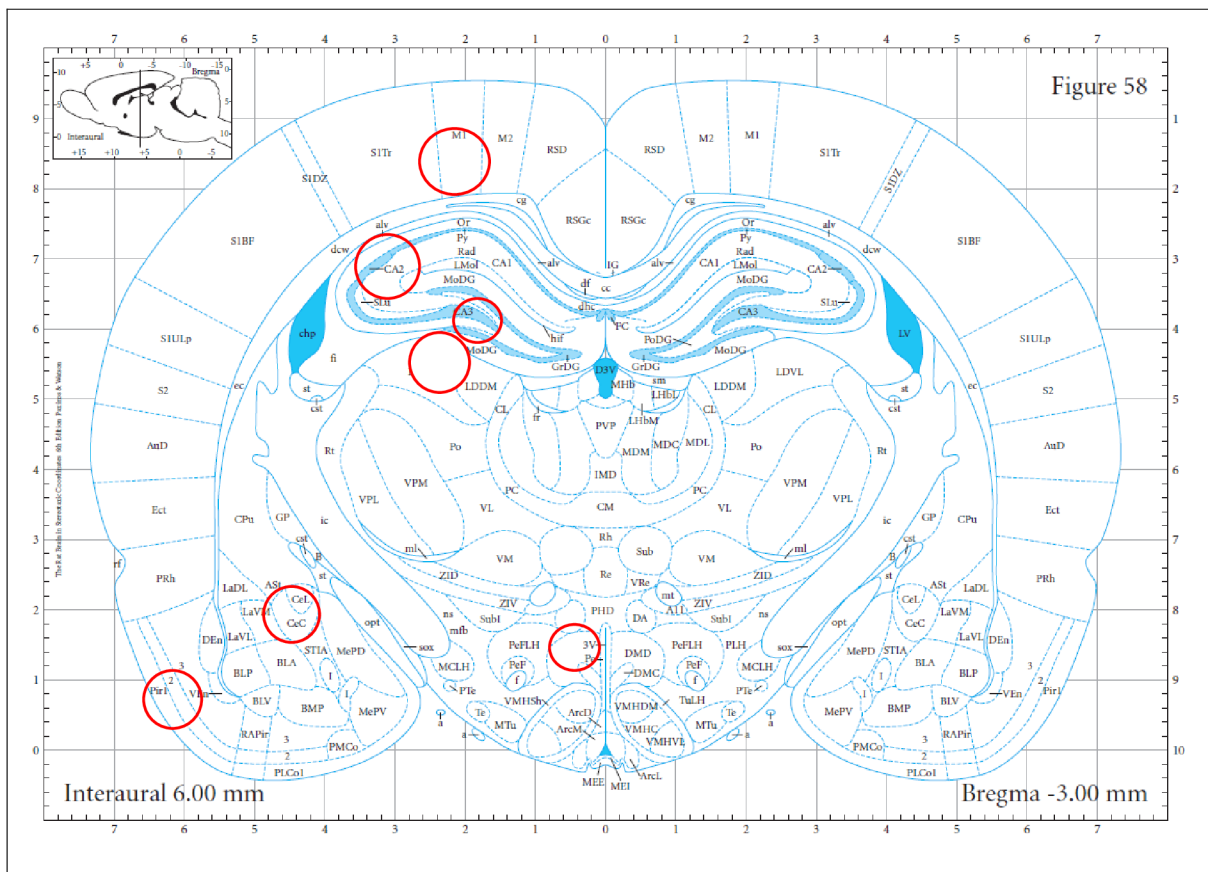
aplikován roztok 3,3'-diaminobenzidu (Bamed s.r.o., České Budějovice, Česká republika) dle Tabulky 9. Následovala lázeň v destilované vodě a klasické odvodnění a zamontování preparátu.

Tabulka 9. Roztok diaminobenzidu

látka	objem/hmotnost
3,3'-diaminobenzidin	10 mg
N,N-dimethylformamid	0,1 ml
30% peroxid vodíku	0,01 ml
fosfátový pufr	20 ml

4.2 Hodnocení preparátů

Vzorky barvené hematoxylinem-eozinem sloužily pouze pro potvrzení přítomnosti cílových struktur a správné neuroanatomické lokalizace řezu a vyloučení hrubých patologií mozkové tkáně. Jednalo se o přítomnost mozkové kůry, piriformní kůry, hipokampu, gyrus dentatus, thalamu, hypothalamu a amygdaly. Vzorky s imunohistochemickým značením byly nejprve hodnoceny semikvantitativně a následně analyzovány pomocí počítačové analýzy obrazu (software Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) v cílových oblastech dle Obrázku 3.



Obrázek 3. Místa hodnocení exprese c-Fos v myších cílových strukturách mozku

Obrázek přejat od Paxinose a Watsona (2006) a modifikován.

4.2.1 Semikvantitativní hodnocení obrazu

Všechny histologické vzorky byly semikvantitativně hodnoceny s použitím mikroskopu BX-51 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Pozitivita c-Fos buněk byla u každého zvířete měřena v daných oblastech v jednom vybraném zorném poli při 400násobném zvětšení. V takovémto zorném poli byla pozitivita buněk hodnocena jako: + mírná, ++ střední pozitivita a +++ vysoká pozitivita.

4.2.2 Počítačová analýza obrazu

Po semikvantitativním hodnocení byly všechny vzorky hodnoceny pomocí počítačové analýzy obrazu. V určených oblastech mozku byla vyfocena dvě zorná pole při 600násobném zvětšení pomocí mikroskopu BX-51 (od Olympus), kamery DP 73 (od Olympus) a softwaru CellSens Entry verze 2.2. K analýze obrazu byl použit software Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA), kdy byla zjišťována

denzita cílových struktur v invertovaném RGB spektru, kde hodnota 0 je bílá a hodnota 255 je černá barva. V každém vyfoceném zorném poli bylo hodnoceno 20 jader.

4.2.3 *Prezentace výsledků a statistické hodnocení*

Výsledné hodnoty jsou prezentovány jako průměr jednotlivých skupin \pm dvojnásobek směrodatné odchylky průměru ($2 \times \text{SEM}$).

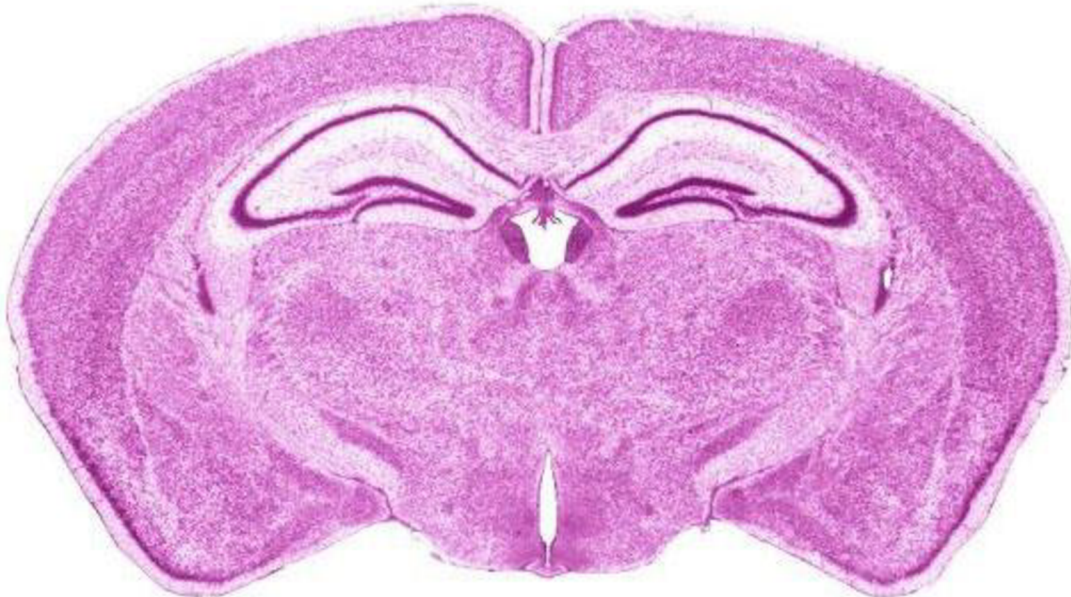
K určení významnosti rozdílů dat byly získané údaje semikvantitativně hodnoceny pomocí testu One-way ANOVA. Neparametrické výsledky počítačová analýzy obrazu byly zhodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova testu doplněného *post hoc* analýzou s Bonferroniho korekcí. Statistická analýza byla provedena pomocí programu IBM SPSS Statistics 24 (IBM, Armonk, New York, USA). Úroveň statistické významnosti byla stanovena na hladině $p < 0,05$.

5. Výsledky

Skupině IMU byla podávána voda obohacená o Juvenil po celou dobu experimentu. Skupině IMU/7 byla podávána voda obohacená o Juvenil 7 dní před ukončením experimentu. Kontrolní skupině byla po celou dobu experimentu podávána kohoutková pítí voda.

5.1 *Hematoxylin-eozin*

Barvení hematoxylin-eozinem potvrdilo požadovanou neuroanatomickou lokalizaci u všech připravených preparátů (Obrázek 4). Barvení rovněž vyloučilo přítomnost jakýchkoliv hrubých histopatologických změn mozkové tkáně.

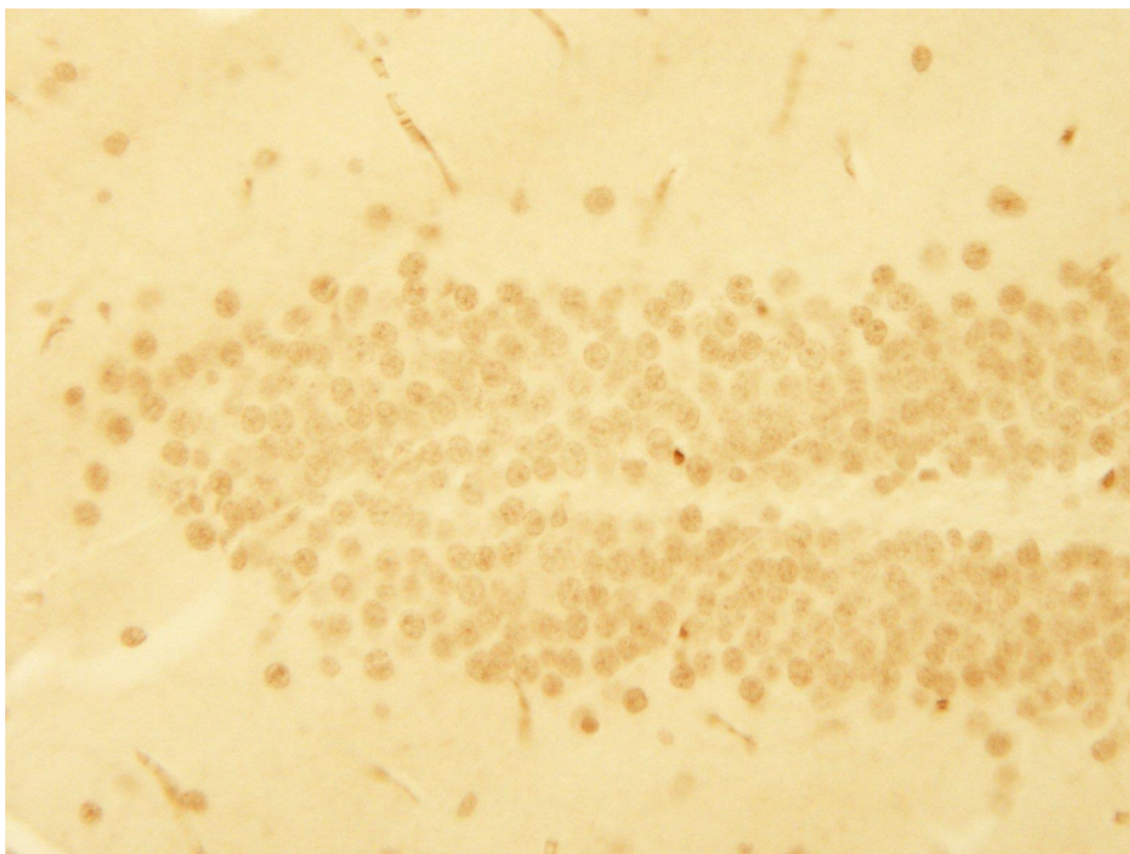


Obrázek 4. Požadovaná neuroanatomická lokalizace

(<https://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>)

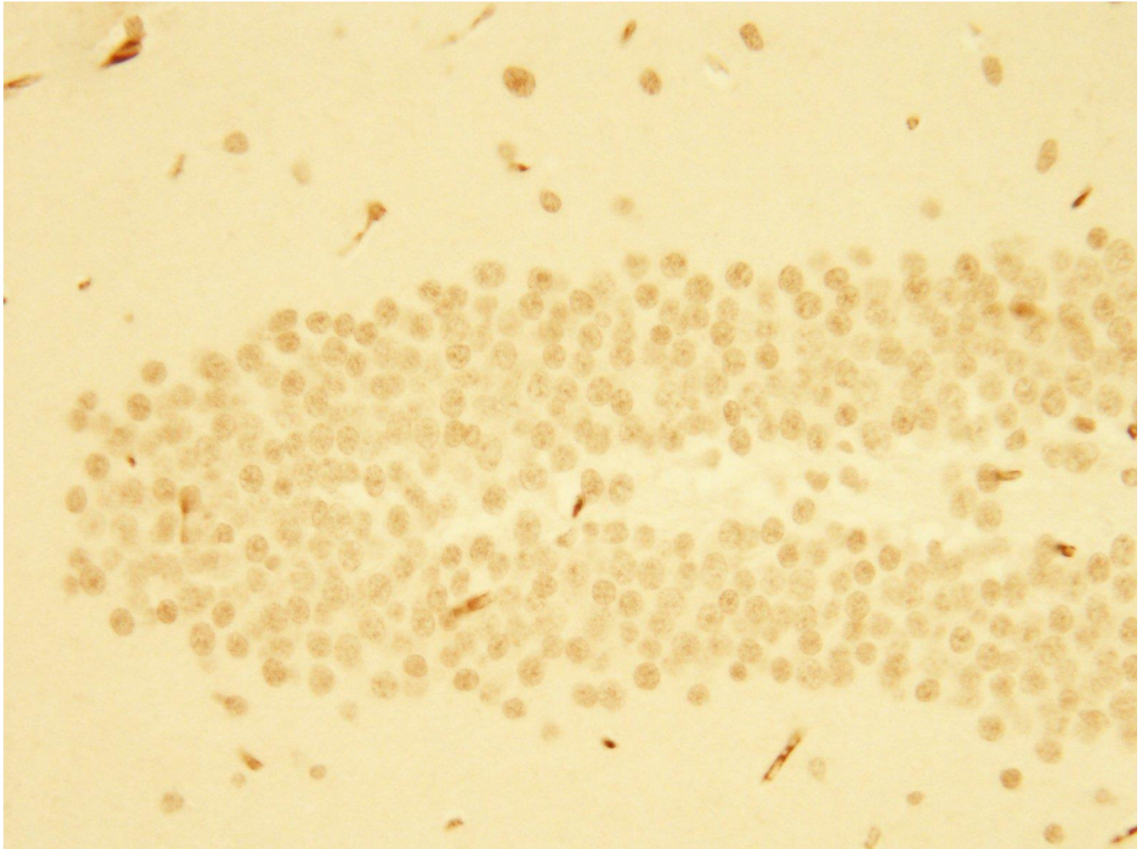
5.1.1 *Detekce exprese c-Fos*

Expese c-Fos byla hodnocena v oblasti CA2 hipokampu, gyrus dentatus hipokampu, thalamu, hypothalamu, amygdaly, piriformní kůře a mozkové kůře. První skupině bylo po celou dobu experimentu podávání pitná kohoutková voda (skupina kontrola). Druhé skupině byla po celou dobu experimentu podávána voda obohacená o Juvenil (skupina IMU). Třetí skupině byla podávána voda obohacená o Juvenil 7 dní před ukončením experimentu (skupina IMU/7).



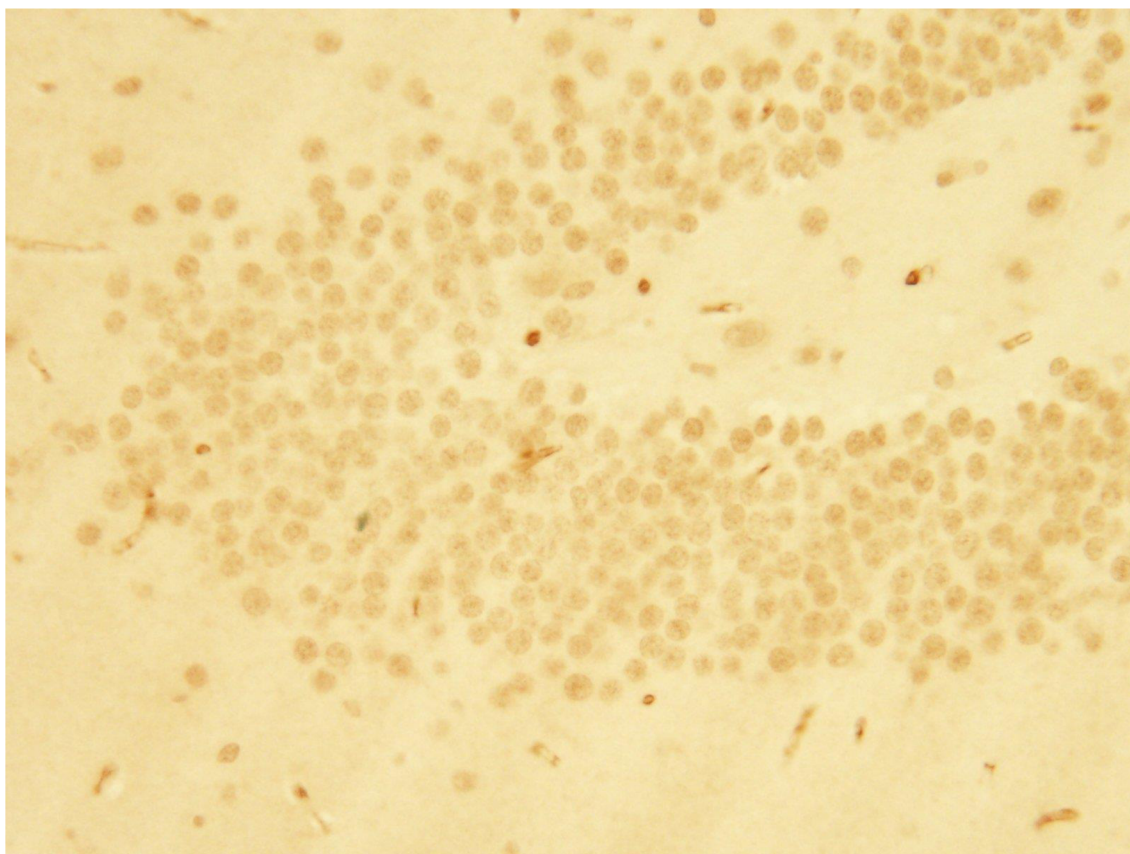
Obrázek 5. Oblast gyrus dentatus, kontrolní skupina

Snímek jedné z hodnocených oblastí (gyrus dentatus) u kontrolní skupiny. Oblast po imunohistochemickém barvení. Tmavší oblasti jsou cévy.



Obrázek 6. Oblast gyrus dentatus, skupina IMU

Snímek jedné z hodnocených oblastí (gyrus dentatus) u skupiny IMU. Oblast po
Imunohistochemickém barvení. Tmavší oblasti jsou cévy



Obrázek 7. Oblast gyrus dentatus, skupina IMU/7

Snímek jedné z hodnocených oblastí (gyrus dentatus) u skupiny IMU/7. Oblast po imunohistochemickém barvení. Tmavší oblasti po proostření obrazu vychází jako cévy.

5.1.2 *Pozitivita buněk v oblasti CA2 hipokampu*

Výsledky semikvantitativního hodnocení a počítačové analýzy obrazu v CA2 oblasti hipokampu jsou uvedeny v Tabulkách 10 a 11. V této oblasti nebyl nalezen signifikantní rozdíl v c-Fos pozitivitě mezi kontrolní skupinou a skupinami léčenými Juvenilem.

Tabulka 10. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v CA2 oblasti hipokampu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	+	++	+++
Kontrola	0,2 \pm 0,36	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU	0,13 \pm 0,19	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU/7	0,83 \pm 1,05	0 \pm 0	0 \pm 0

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

Tabulka 11. Průměrné hodnoty denzity jader buněk v CA2 oblasti hipokampu měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	Kontrola	IMU	IMU/7
Denzita	60,93 \pm 3,33	60,55 \pm 2,56	63,12 \pm 2

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

5.1.3 *c-Fos pozitivita buněk v gyrus dentatus hipokampu*

Výsledky semikvantitativního hodnocení a počítačové analýzy obrazu v gyrus dentatus hipokampu jsou uvedeny v Tabulkách 12 a 13. V této oblasti nebyl nalezen rozdíl v expres c-Fos mezi kontrolní skupinou a skupinami ovlivněnými Juvenilem.

Tabulka 12. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v gyrus dentatus hipokampu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	+	++	+++
Kontrola	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU/7	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

Tabulka 13. Průměrné hodnoty denzity jader buněk v gyrus dentatus hipokampu měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	Kontrola	IMU	IMU/7
Denzita (D)	55,4 \pm 1,86	54,15 \pm 2,95	57,61 \pm 1,98

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

5.1.4 *c-Fos pozitivita buněk v oblasti thalamu (dorzomediální a ventrolaterální část laterodorzálních jader)*

Výsledky semikvantitativního hodnocení a počítačové analýzy obrazu v laterodorzálních jádrech thalamu jsou uvedeny v Tabulkách 14 a 15. V této nebyl potvrzen rozdíl exprese c-Fos mezi kontrolní skupinou a skupinami ovlivněnými Juvenilem.

Tabulka 14. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v thalamu (průměr $\pm 2 \times \text{SEM}$).

Skupina	+	++	+++
Kontrola	0,1 \pm 0,18	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU/7	0,33 \pm 0,21	0 \pm 0	0 \pm 0

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda),
 IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt
 Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před
 ukončením experimentu).

Tabulka 15. Průměrné hodnoty denzity jader buněk v thalamu měřené pomocí
 počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times \text{SEM}$).

Skupina	Kontrola	IMU	IMU/7
Denzita (D)	65,6 \pm 1,99	62,43 \pm 3,1	68,47 \pm 2,89

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda),
 IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt
 Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před
 ukončením experimentu).

5.1.5 *c-Fos pozitivita buněk v oblasti hypothalamu (oblast dorsomedialních jadra)*

Výsledky semikvantitativního hodnocení a počítačové analýzy obrazu dorzomediálních jader hypothalamu jsou uvedeny v Tabulkách 16 a 17. V této oblasti nebyl pozorován rozdíl v expresi c-Fos mezi kontrolní skupinou a skupinami ovlivněnými Juvenil.

Tabulka 16. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v hypothalamu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	+	++	+++
Kontrola	0,7 \pm 0,83	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU	1,88 \pm 1,59	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU/7	0,17 \pm 0,21	0 \pm 0	0 \pm 0

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

Tabulka 17. Průměrné hodnoty denzity jader buněk hypothalamu měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	Kontrola	IMU	IMU/7
Denzita (D)	80,7 \pm 3,09	78,33 \pm 3,76	77,3 \pm 2,82

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

5.1.6 *c-Fos pozitivita buněk v oblasti amygdaly (centrální jádra)*

Výsledky semikvantitativního hodnocení a počítačové analýzy obrazu v centrálních jádrech amygdaly jsou uvedeny v Tabulkách 18 a 19. V této oblasti nebyl zjištěn signifikantní rozdíl exprese c-Fos mezi kontrolní skupinou a skupinami ovlivněnými Juvenilem.

Tabulka 18. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v amygdale (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	+	++	+++
Kontrola	1,7 \pm 1,12	0,2 \pm 0,36	0 \pm 0
IMU	1,88 \pm 1,28	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU/7	2,17 \pm 1,48	0 \pm 0	0 \pm 0

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

Tabulka 19. Průměrné hodnoty denzity jader buněk amygdaly měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	Kontrola	IMU	IMU/7
Denzita (D)	65,5 \pm 1,9	64,45 \pm 3,66	71,6 \pm 4,97

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

5.1.7 *c-Fos pozitivita buněk v piriformní kůře*

Výsledky semikvantitativního hodnocení a počítačové analýzy obrazu v piriformní kůře jsou uvedeny v Tabulkách 20 a 21. Semikvantitativní hodnocení neodhalilo jakýkoliv statisticky významný rozdíl. Avšak pomocí analýzy obrazu byl pozorován signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami léčenými Juvenilem ($p = 0,025$).

Tabulka 20. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v piriformní kůře (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	+	++	+++
Kontrola	2,1 \pm 0,87	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU	2 \pm 1,26	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU/7	1,67 \pm 1,12	0 \pm 0	0 \pm 0

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

Tabulka 21. Průměrné hodnoty denzity jader buněk piriformní kůry měřené pomocí počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	Kontrola	IMU	IMU/7
Denzita (D)	64,15 \pm 3,93	67,23 \pm 4,6	61,07 \pm 3,74*

*Signifikantní rozdíl mezi skupinou IMU a IMU/7 na hladině $p < 0,05$.

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda), IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před ukončením experimentu).

5.1.8 *c-Fos pozitivita buněk v kortexu (primární motorická kůra M1)*

Výsledky semikvantitativního hodnocení a počítačové analýzy obrazu v primární motorické kůře jsou uvedeny v Tabulkách 22 a 23. Signifikantní rozdíly odhalila pouze počítačová analýza obrazu, při které byl nalezen signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami léčenými Juvenilem ($p = 0,043$).

Tabulka 22. Výsledky semikvantitativního hodnocení exprese c-Fos v motorické kůře
(průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	+	++	+++
Kontrola	6 \pm 2,35	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU	5,63 \pm 3,1	0 \pm 0	0 \pm 0
IMU/7	6,67 \pm 2,38	0 \pm 0	0 \pm 0

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda),
IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt
Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před
ukončením experimentu).

Tabulka 23. Průměrné hodnoty denzity jader buněk motorické kůry měřené pomocí
počítačové analýzy obrazu (průměr $\pm 2 \times$ SEM).

Skupina	Kontrola	IMU	IMU/7
Denzita (D)	74,48 \pm 3,14	76,49 \pm 2,48	69,32 \pm 5,5

Kontrola, kontrolní skupina (po celou dobu experimentu byla podávána pitná voda),
IMU skupina (po celou dobu experimentu byla podávána voda obohacená o extrakt
Juvenil), IMU/7 skupina (voda obohacená o Juvenil byla podávána 7 dní před
ukončením experimentu).

6. Diskuse

Extrakt Juvenil je modulátor biologických reakcí a má pozitivní vliv na mikrobiom ve střevě (Kubelková, et al., 2020). Nové studie ukazují pozitivní vliv střevní mikroflóry na lidské zdraví a psychiku, proto se na trhu s doplňky stravy objevují přípravky, které fungují jako modulátory, které zprostředkovávají příznivý účinek na mozek (Long-Smith, et al., 2020). Protein c-Fos se využívá jako funkční marker aktivity v neuronech a neurálních obvodech pro různé druhy stimulů (Hoffman, et al., 1993).

Cílem mé bakalářské práce bylo potvrzení nebo vyvrácení vědecké hypotézy o zvýšení exprese proteinu c-Fos v mozku myši po aplikaci extraktu Juvenil. Dalším cílem bylo studium vybraného c-Fos protoontogenu jako důležitého modulátoru biologických funkcí. Pro tento pokus byly vybrány myši kmen Balb/c.

Kontrolní skupině myši byla podávána kohoutková pitná voda po celou dobu pokusu. První testované skupině myši byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil (1,0 mg/100 ml) po celou dobu experimentu. Druhé testované skupině myši byla podávána voda obohacená o extrakt Juvenil (1,0 mg/100 ml) 7 dní před ukončením experimentu.

Pro analýzu námi vybraných sedmi mozkových struktur (mozkové kůry, piriformní kůry, hipokampu, gyrus dentatus, thalamu, hypothalamu a amygdaly) jsme použili nejdříve semikvantitativní analýzu. Semikvantitativní analýza preparátů neodhalila signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinami experimentálními v žádné námi vybrané mozkové struktuře. Jako druhou analytickou metodu jsme použili program pro analýzu obrazu a poté statické hodnocení pomocí Kruskal-Wallisova testu na hladině $p < 0,05$. Počítačová analýza denzity buněk a statistická analýza odhalily statisticky významný rozdíl pouze ve dvou z námi sedmi vybraných mozkových strukturách. V piriformní kůře byl rozeznán rozdíl denzity buněk mezi oběma skupinami léčenými Juvenilem ($p = 0,025$). Rozdíl v pozitivitě byl také rozeznán v primární motorické kůře kortexu, a to opět mezi oběma skupinami léčenými extraktem Juvenilem ($p = 0,043$). Jako pozitivní oblasti nám vyšly piriformní kůra, která má funkci příjmu čichových vjemů a primární motorická oblast kortexu, která stimuluje svalovou kontrakci. Avšak tato pozitivita u obou struktur je pravděpodobně způsobena tím, že se jedná o koncové oblasti mozku a mohlo tedy dojít k falešné pozitivitě způsobené vykrytalizováním imunohistochemického barviva. V daných strukturách u některých preparátů také došlo

k neúplnému nabarvení. U některých vzorků došlo v piriformní oblasti k potrhání preparátu a kvůli tomu k následné krystalizaci barviva a mohlo tedy dojít k falešné signalizaci positivity.

Z našich výsledků získaných v rámci zpracování bakalářské práce lze vyvodit, že perorální podávání extraktu Juvenilu, rozpuštěného ve vodě, má nejspíše minimální vliv na expresi protoonkogenu c-Fos a následnou expresi c-Fos proteinu v mozcích Balb/c myši. K potvrzení či vyvrácení našich výsledků je třeba celou studii zopakovat v rámci dalších studií použití biomodulátoru.

7. Seznam literatury

- Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., et al., Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species, *Science*, 331 (6015) (2011), pp. 337-341
- Burcelin R., Gut microbiota and immune crosstalk in metabolic disease, *Mol Metab*, 5 (9) (2016), pp. 771-781
- van Buren CT., Rudolph FB., Dietary nucleotides: a conditional requirement. *Nutrition* 1997; 13(5): 470–472
- Cani P.D., Everard A., Duparc T., Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism, *Curr Opin Pharmacol*, 13 (6) (2013), pp. 935-940
- Castellarin M., Warren R.L., Freeman J.D., Dreolini L., Krzywinski M., Strauss J., et al., *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma, *Genome Res*, 22 (2) (2012), pp. 299-306
- Chareyron L. J., Lavenex P. B., Amaral D. G., Lavenex P., Stereological Analysis of the Rat and Monkey Amygdala, *J Comp Neurol*, 2015, 519(16), pp. 3218–3239., 10.1002/cne.22677
- Clarke G., Sandhu K. V., Griffin B. T, Dinan T.G., Cryan J. F and Hyland N. P., Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions, *Pharmacological Reviews*, 2019, 71 (2) 198-224; DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.118.015768>
- Cohen J., Vaginal microbiome affects HIV risk, *Science*, 353 (6297) (2016), p. 331
- Cory JG. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. In: Devlin, T. M. ed. *Textbook of Biochemistry*, Wiley-Liss, Inc. New York, USA, 1992, pp. 529–571
- Cryan J. F. and Dinan T.G., Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour, *Nat Rev Neurosci*, 13 (10) (2012), pp. 701-712
- Dolezal B, Rakusan B, Urbanek G, Vystrcil A, Zicha K, Zicha O. Retisin – A new tissue preparation. *Cesk Farm* 1954 Sep;3(7):246-247.
- Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, Blaser H, Bray MR, Mak TW. Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol Cell*. 2015;60(4):524-36
- Duncan S.H., Louis P., Thomson J.M., Flint H.J., The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota, *Environ Microbiol*, 11 (8) 2009, pp. 2112-2122
- Duskova K., Cechakova L., Plzakova L., Sinkorova Z., Kubelkova K.: Natural immune booster Juvenil significantly affects the proliferation of tumor cells. *Med. Sci. Lett*. 2019, 88, 3, 106-114. doi: 10.31482/mmsl.2019.007.
- Giannelli V., Di Gregorio V., Iebba V., Giusto M., Schippa S., Merli M., et al., Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis, *World J Gastroenterol*, 20 (45) 2014, pp. 16795-16810

- Goh Y.J. and Klaenhammer T.R., Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes, *Annu Rev Food Sci Technol*, 6 (2015), pp. 137-156
- Fabiola N. Velazquez, Beatriz L. Caputto, François D. Boussin. c-Fos importance for brain development. *Aging (Albany NY)*. 2015; 7(12): 1028-1029. doi: 10.18632/aging.100862.
- Fabiola N. Velazquez, César G. Prucca, Olivier Etienne, Diego S. D'Astolfo, David C. Silvestre, François D. Boussin, and Beatriz L. Caputto, *Oncotarget*. Brain development is impaired in c-fos $-/-$ mice, 201; 6(19): 16883–16901. doi: 10.18632/oncotarget.4527.
- Flachs P. Myší kongenní kmeny, Praha, 2007, bakalářská práce, přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce Ing. Zdeněk Trachtulec, Dr.
- Flint H.J., Scott K.P., Louis P., Duncan S.H., The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9 (10) (2012), pp. 577-589
- Forslund K., Hildebrand F., Nielsen T., Falony G., Le Chatelier E., Sunagawa S., et al., MetaHIT Consortium, Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota, *Nature*, 528 (7581) (2015), pp. 262-266
- Gu S., Chen Y., Zhang X., Lu H., Lv T., Shen P., et al., Identification of key taxa that favor intestinal colonization of *Clostridium difficile* in an adult Chinese population, *Microbes Infect*, 18 (1) (2016), pp. 30-38
- Heydel J-M., Holsztyńska J. E., Legendre A., Thiebaud N., Artur Y., Le Bon A-M., UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function, 2010, *Drug Metabolism Reviews* 42(1):74-97, DOI: 10.3109/03602530903208363
- Hoffman G. E., Smith M. S., Verbalis G. J, C-Fos and related Immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems, *frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 14, No. 3, pp. 173-213, 1993
- Illig K. R. and Wilson D. A., *Encyclopedia of Neuroscience*, 2009, pp. 101-106
- Jared M Ordway, Steven D Fenster, Hong Ruan, Thomas Curran, A transcriptome map of cellular transformation by the fos oncogene. *Mol Cancer*. 2005; 4: 19. doi: 10.1186/1476-4598-4-19.
- Jiang H., Ling Z., Zhang Y., Mao H., Ma Z., Yin Y., et al., Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder, *Brain Behav Immun*, 48 (2015), pp. 186-194
- Johnson M. *Laboratory mice and rats*. Labome, 2012; 2:113, DOI//dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.113
- Kang Z., Zhang J., Zhou J., Qi Q., Du G., Chen J., Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B₁₂, *Biotechnol Adv*, 30 (6) (2012), pp. 1533-1542

- Kubelková K., Hubalek M., Rehulka P., Rehulkova H., Friedecky D., Zakova J., Macela A., Molecular characterization of alcohol-ether extract from bovine tissue, *Mil. Med. Sci. Lett.* 2021, 90, 1-17, DOI: 10.31482/mmsl.2021.012
- Kubelkova K. and Macela A.: Microbiota-gut-brain Signaling: a nimirreview. *Med. Sci. Lett.* 2020, 89(1):41-45.
- Kubelková K. and Macela A., 2019. A short history of Juvenil - An Original Tissue extract. *Military Medical Science Letters.* 88. 10.31482/mmsl.2019.008.
- Kubelkova K., Rychlik I., Crhanova M., Karasova D., Slizova D., Zakova J., Luksikova L., and Macela A.: Gut microbiota alterations by nutritional supplement Juvenil. *Med. Sci. Lett.* 2020, 89(3):114-125
- Larsbrink J., Rogers T.E., Hemsworth G.R., McKee L.S., Tauzin A.S., Spadiut O., et al., A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes, *Nature*, 506 (7489) (2014), pp. 498-502
- Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity, *Nature*, 444 (7122) (2006), pp. 1022-1023
- Ling Z., Jin C., Xie T., Cheng Y., Li L., Wu N., Alterations in the fecal microbiota of patients with HIV-1 infection: an observational study in a Chinese population, *Sci Rep*, 6 (2016), Article 30673
- Long-Smith C., O'Riordan K. J., Clarke G., Stanton C., Dinan T. G., Cryan J. F.: Microbiota-Gut-Brain axis: New therapeutic opportunities. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2020, 60:477-502
- Nardone G. and Rocco A., Probiotics: a potential target for the prevention and treatment of steatohepatitis, *J Clin Gastroenterol*, 38 (Suppl 2) (2004), pp. S121-S122
- van Nimwegen F.A., Penders J., Stobberingh E.E., Postma D.S., Koppelman G.H., Kerkhof M., et al., Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy, *J Allergy Clin Immunol*, 128 (5) (2011), pp. 948-955
- Norton SA. Raw animal tissues and dietary supplements. *N Engl J Med.* 2000;343(4):304-5
- Nguyen A., Vieira-Silva S., Liston, A., Raes J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research?. *Disease models & mechanisms.* 8. 1-16. 10.1242/dmm.017400.
- Madsen K.L., Doyle J.S., Jewell L.D., Tavernini M.M., Fedorak R.N., Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice, *Gastroenterology*, 116 (5) (1999), pp. 1107-1114
- O'Hara A.M. and Shanahan F., The gut flora as a forgotten organ, *EMBO Rep*, 7 (7) (2006), pp. 688-693
- Pop M. G., Crivii C., Opincariu J., *Anatomy and Function of the Hypothalamus*, 2017, DOI: 10.5772/intechopen.80728

- Quan R, Barness LA, Uauy R. Do infants need nucleotide supplemented formula for optimal nutrition? *J. Pediatr. Gasstroenterol. Nutr.* 1990; 11: 429–427
- Richterová S., Richter J., Turek B., Application of Juvenil in modulation of health, *CZ hyg.* 41, 1996, p.319-323
- Richter J., Šíma P., Pelech L., Turek B.: nukleotides and their importance in nutrition prevence and immunity, 1996, *Hygiena*, 41,19976, No 6, 319-326
- Ridaura V.K., Faith J.J., Rey F.E., Cheng J., Duncan A.E., Kau A.L., et al., Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice, *Science*, 341 (6150) (2013), Article 1241214
- Rodwell VW. Nucleotides. In: Murray KR, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. eds. *Harper's Biochemistry*, Prentice-Hall International Inc., London, 1993: 353–362.
- Rogier E.W., Frantz A.L., Bruno M.E., Wedlund L., Cohen D.A., Stromberg A.J., et al., Lessons from mother: long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring, *Gut Microbes*, 5 (5) (2014), pp. 663-668
- Round J.L. and Mazmanian S.K., The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease, *Nat Rev Immunol*, 9 (5) (2009), pp. 313-323
- Roux JM. Nucleotide supply of the developing animal: role of so called 'salvage pathways.' *Enzyme* 1973; 15(1): 361–377
- Russell S.L., Gold M.J., Hartmann M., Willing B.P., Thorson L., Wlodarska M., et al., Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma, *EMBO Rep*, 13 (5) (2012), pp. 440-447
- Sanapareddy N., Legge R.M., Jovov B., McCoy A., Burcal L., Araujo-Perez F., et al., Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans, *ISME J*, 6 (10) (2012), pp. 1858-1868
- Sommer F. and Bäckhed F., The gut microbiota—masters of host development and physiology, *Nat Rev Microbiol*, 11 (4) (2013), pp. 227-238
- Torrice T. J., Munakomi S., *Neuroanatomy, Thalamus*, StatPearls Publishing; 2019, PMID: 31194341
- Ursell L.K., Haiser H.J., Van Treuren W., Garg N., Reddivari L., Vanamala J., et al., The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host, *Gastroenterology*, 146 (6) (2014), pp. 1470-1476
- Wang L., Christophersen C.T., Sorich M.J., Gerber J.P., Angley M.T., Conlon M.A., Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism, *Appl Environ Microbiol*, 77 (18) (2011), pp. 6718-6721
- Wang B., Jiang X., Cao M., Ge J., Bao Q., Tang L., et al., Altered fecal microbiota correlates with liver biochemistry in nonobese patients with non-alcoholic fatty liver disease, *Sci Rep*, 6 (2016), Article 32002

- Wang J., Lang T., Shen J., Dai J., Tian L., Wang X., Core Gut Bacteria Analysis of Healthy Mice, *Frontiers in Microbiology*, 2019; 10: 887., doi: 10.3389/fmicb.2019.00887
- Xue X. and Falcon D., The Role of Immune Cells and Cytokines in Intestinal Wound Healing, *Int J Mol Sci*. 2019 Dec; 20(23): 6097., DOI: 10.3390/ijms20236097
- Xu M., Wang B., Fu Y., Chen Y., Yang F., Lu H., et al., Changes of fecal Bifidobacterium species in adult patients with hepatitis B virus-induced chronic liver disease, *Microb Ecol*, 63 (2) (2012), pp. 304-313
- Zackular J.P., Baxter N.T., Iverson K.D., Sadler W.D., Petrosino J.F., Chen G.Y., et al., The gut microbiome modulates colon tumorigenesis, *MBio*, 4 (6) (2013), pp. e00692-e00713
- Zemla R., Basu J., Hippocampal function in rodents, *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 43: 187–197., DOI: 10.1016/j.conb.2017.04.005

8. Seznam internetových zdrojů

<https://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>, 24.3. 2021,

<http://atlas.brain->

[map.org/atlas?atlas=1&plate=100960092#atlas=1&plate=100960092&resolution=19.25&x=5504.222790948276&y=4191.915051690464&zoom=-4](http://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1&plate=100960092#atlas=1&plate=100960092&resolution=19.25&x=5504.222790948276&y=4191.915051690464&zoom=-4), 24.3. 2021,

<https://www.poradnaprozdravi.cz/slovník-pojmu/biotin-vitamin-b7-vitamin-h-detail-1310>, 23.3.2021

https://www.dartmouth.edu/~rswenson/NeuroSci/chapter_11.html4, 25.2. 2021

<https://www.cukrovka.cz/cukrovka-typu-2-2>, 23.3. 2021

http://www.informatics.jax.org/inbred_strains/mouse/docs/BALB.shtml, 21.11. 2020

<https://www.healthylifegen.com/IngredientsList.html>, 21.11. 2020

<https://www.healthline.com/health/proto-oncogene#vs-oncogene>, 28.10.2020

<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/metabolome>, 23.3. 2021

<https://www.vitalvibe.eu/cs/clanky/246-nejvice-diskutovany-ale-take-podcenovany-vitamin-b12>, 23.3.2021

<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/brain/mouse+brain>, 21.11. 2020

<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/brain/mouse+brain>, 21.11. 2020

<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/organs-and-tissues/immunity-in-the-gut>, 24.3. 2021

<https://www.celostnimedicina.cz/riboflavin.htm>, 23.3. 2021

<https://www.uzis.cz/index.php?pg=vystupy--tematicke-rady>, 28.3. 2021

<https://www.vyzivaspol.cz/vitamin-k/>, 23.3. 2021