

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Posuzování změn dietetického příjmu s vysokým obsahem
tuků a sacharidů a jeho vlivu na metabolismus a chovné
parametry laboratorních myší**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Matouš Sterzik

Obor studia: Živočišná produkce

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Plachý, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Posuzování změn dietetického příjmu s vysokým obsahem tuků a sacharidů a jeho vlivu na metabolismus a chovné parametry laboratorních myši" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Vladimírovi Plachému, Ph.D. za praktické a cenné rady, pomoc a odborné vedení. Dále bych chtěl poděkovat MVDr. Liborovi Kopkanovi, Ph.D. a Mgr. Kláře Dohnalové, kteří mi trpělivě pomáhali s experimentální částí a obětovali ji spoustu své energie.

Posuzování změn dietetického příjmu s vysokým obsahem tuků a sacharidů a jeho vlivu na metabolismus a chovné parametry laboratorních myší

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo zjistit a posoudit vliv vysokotučných a vysokosacharidových diet na metabolismus lipidů a chovné parametry laboratorních myší. Celkem bylo použito 6 diet, z toho bylo 5 diet experimentálních (v textu značeny čísla 1-5) a 1 kontrolní dieta, která je běžně užívána pro chov laboratorních myší (v textu značena písmenem n). Diety 1 a 4 měly stejně vysoké obsahy tuků a sacharidů, složení se však lišilo složením nasycenosti vazeb mastných kyselin kvůli odlišnému zdroji tuku. Diety 2 a n byly charakteristické velmi vysokým obsahem škrobu, dieta 2 však měla navíc ještě poměrně vysoký obsah sacharidů. Diety 3 a 5 byly významné nejvyšším obsahem tuku a dieta 5 měla navíc i celkově nejvyšší obsah sacharidů. Nejvyšší zastoupení nasycených mastných kyselin poměrově k nenasyceným mastným kyselinám měly diety 3 a 4, ostatní diety měly poměrově značně vyšší zastoupení nenasycených mastných kyselin. Pro sledování vlivu těchto diet na metabolismus a chovné parametry bylo použito 41 samců laboratorních myší z kmene C57Bl/6NCrl. Tito samci byli 6 týdnů na experimentální či kontrolní dietě. Samci a diety byli každý týden váženi. Z těchto vah se počítaly hodnoty týdenní spotřeby krmiva, týdenního přírůstky a konverze krmiva. Z krve byla nejprve centrifugací oddělena plazma. Část plazmy se odebrala a použila na biochemickou analýzu, ze které byly naměřeny hladiny LDL, HDL, TG a celkového cholesterolu, které byly dle očekávání nejvyšší u diet 3, 4 a 5. Další část plazmy byla použita pro zjištění lipidového profilu, který byl měřen hmotnostním spektrometrem. Nejvyšší hladiny nasycených i nenasycených bylo u samců na dietách 3 a 4 a nejnižší na dietách 1 a 2. Nejvyšší hladiny esterů cholesterolu bylo u samců na dietách 3, 4 a 5, nejnižší hladiny u samců na dietách 1 a n. Lipidový profil byl naměřen také u diet pomocí hmotnostního spektrometru. Bylo zjištěno, že složení mastných kyselin diet bylo velmi podobné složení mastných kyselin v krevní plazmě. Závěrem lze konstatovat, že lipidové složení diet hraje velkou úlohu v metabolismu. Je tedy důležité vědět, jaké množství a složení tuků přijímáme, protože při nevyváženém poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin může dojít k obezitě a dalším onemocněním, které s ní úzce souvisí.

Klíčová slova: laboratorní myši, diety, chovné parametry, lipidy, metabolismus

Comparison of changes in dietary intake with high content of fats and carbohydrates and its effect on metabolism and breeding parameters of laboratory mice

Summary

The aim of the diploma thesis was to determine and assess the effect of high-fat and high-carbohydrate diets on lipid metabolism and breeding parameters of laboratory mice. A total of 6 diets were used, of which 5 were experimental diets (indicated by numbers 1-5) and 1 control diet, which is commonly used for breeding laboratory mice (indicated by the letter n in the text). Diets 1 and 4 had the same high contents of fats and carbohydrates, but the composition differed in the composition of the saturation of the fatty acid bonds due to the different fat source. Diets 2 and n were characterized by a very high starch content, but diet 2 also had a relatively high carbohydrate content. Diets 3 and 5 had significant highest fat content, and diet 5 also had the highest overall carbohydrate content. Diets 3 and 4 had the highest proportion of saturated fatty acids relative to unsaturated fatty acids, other diets had a relatively higher proportion of unsaturated fatty acids. 41 male laboratory mice from the C57B1 / 6Ncr1 strain were used to monitor the effect of these diets on metabolism and breeding parameters. These males were on an experimental or control diet for 6 weeks. Males and diets were weighed weekly. From these weights, the values of weekly feed consumption, weekly increments and feed conversion were calculated. Plasma was first separated from the blood by centrifugation. A portion of the plasma was collected and used for biochemical analysis, from which LDL, HDL, TG and total cholesterol levels were measured, which were expected to be highest in diets 3, 4 and 5. Another portion of plasma was used to determine the lipid profile, which was measured mass spectrometer. The highest levels of saturated and unsaturated were in males on diets 3 and 4 and the lowest on diets 1 and 2. The highest levels of cholesterol esters were in males on diets 3, 4 and 5, the lowest levels in males on diets 1 and n. The lipid profile was measured also for diets using a mass spectrometer. The fatty acid composition of the diets was found to be very similar to that of plasma fatty acids. In conclusion, the lipid composition of diets plays a major role in metabolism. It is therefore important to know how much and how much fat we eat, because an unbalanced ratio of saturated and unsaturated fatty acids can lead to obesity and other diseases that are closely related to it

Keywords: laboratory mice, diets, breeding parameters, lipids, metabolism

Obsah

1 Úvod	I
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	II
3 Literární rešerše	III
3.1 Myš jako experimentální subjekt	III
3.1.1 Manipulace s myšmi	III
3.2 Možné vlivy ovlivňující experimentální výsledky	V
3.2.1 Morfologické, fyziologické a genetické změny u laboratorních myší.....	V
3.2.1.1 Význam sentinelových zvířat	VII
3.2.2 Vliv sociální dominance	VII
3.2.2.1 Agrese mezi samci	VIII
3.2.3 Vliv světelného režimu.....	IX
3.3 Vliv výživy na fyziologické funkce u myší	X
3.3.1 Patofyziologické mechanismy rozvoje metabolických poruch a orgánové dysfunkce.....	X
3.3.1.1 Indukce systémového chronického zánětu dietetickým vysokotukovým příjmem	XI
3.3.1.2 Obezita	XII
3.3.1.3 Inzulínová rezistence a cukrovka 2. typu	XII
3.3.1.4 Poruchy centrálního nervového systému	XIII
3.3.1.5 Vliv na kardiovaskulární systém.....	XIII
3.3.1.6 Střevní nemoci	XIV
3.3.1.7 Osteoporóza	XV
3.3.1.8 Chronická onemocnění ledvin	XV
3.3.1.9 Nádorová onemocnění	XV
3.4 Vliv nasycenosti vazeb a délky řetězců mastných kyselin na metabolismus	XVII
3.5 Důležitost celkového cholesterolu a triglyceridů	XIX
4 Metodika	XX
4.1 Postup při vážení myší a odběru krve	XX
4.2 Postup při extrakci lipidů	XXI
4.2.1 Extrakce lipidů z plazmy.....	XXI
4.2.2 Extrakce lipidů z krmiva	XXI
4.3 Diety	XXIII
4.3.1 Dieta 1 (E15744)	XXIII
4.3.2 Dieta 2 (E157451)	XXIII

4.3.3	Dieta 3 (E15186)	XXIV
4.3.4	Dieta 4 (E15746)	XXIV
4.3.5	Dieta 5 (E15742)	XXV
4.3.6	Kontrolní dieta (n).....	XXV
4.3.7	Porovnání diet.....	XXVI
4.4	Zpracování dat	XXVIII
5	Výsledky	XXIX
5.1	Chovné parametry.....	XXIX
5.2	Výsledky biochemické analýzy	XXXII
5.3	Délka a nasycenost vazeb mastných kyselin v plazmatických triglyceridech a esterech cholesterolů	XXXVI
5.4	Analýza diet	XL
6	Diskuze	XLII
7	Závěr	XLIV
8	Literatura.....	XLV

1 Úvod

Moderní konzumní styl života je často spojen s nadměrným příjmem tuků a sacharidů. Tento životní styl dlouhodobě vede k rozvoji řady dalších metabolických poruch a působí také jako rizikový faktor dalších civilizačních onemocnění, jako je obezita, hypertenze, ischemická choroba srdeční, diabetes a metabolický syndrom. Proto je důležité sledovat možné metabolické změny způsobené nesprávným dietetickým příjmem nevyvážené stravy a popsat rizikové faktory, které se uplatňují v rozvoji civilizačních chorob.

Výskyt obezity, jednoho z nejčastějších civilizačních onemocnění, ve světě narůstá. Od roku 1975 se podle Světové zdravotnické organizace téměř ztrojnásobil. Obezita mnohonásobně zvyšuje riziko vzniku cukrovky či různých kardiovaskulárních onemocnění. Také způsobuje i jiné zdravotní komplikace, jako je vysoký krevní tlak, spánková apnoe, nádorová onemocnění či nemoci ledvin. Na následky obezity ročně zemře ve světě přes 2,8 milionu lidí (Lang a kol. 2019).

S obezitou souvisí také ukládání tuků v játrech. To může mít za následek například nealkoholové ztučnění jater, které postihuje přibližně čtvrtinu dospělé populace a je v současnosti nejčastějším onemocněním jater na světě. Charakteristickým znakem nealkoholového ztučnění jater je jaterní steatóza neboli hromadění lipidů v jaterních buňkách. Nealkoholové ztučnění jater je spojeno se zvýšenou úmrtností, zejména v důsledku kardiovaskulárních onemocnění, hepatocelulárního karcinomu a dalších příhod souvisejících s játry. Také dochází k metabolickým dysfunkcím, jako je inzulínová rezistence a dyslipidemie a následným kardiovaskulárním onemocněním (Ipsen a kol. 2018).

Játra jsou základním orgánem v metabolismu lipidů. Fungují jako centrální regulátor lipidové homeostázy. Jsou zodpovědná za řízení syntézy nových mastných kyselin, jejich export a následnou redistribuci do jiných tkání. Tyto procesy jsou úzce regulovány složitými interakcemi mezi hormony, jadernými receptory a transkripčními faktory, které udržují homeostázu lipidů v játrech. Narušení jedné nebo více z těchto interakcí může urychlit zadržování tuku v játrech a následný vývoj nealkoholového ztučnění jater. Hromadění jaterního tuku je výsledkem nerovnováhy mezi získáváním lipidů a jejich odstraňováním (Ipsen a kol. 2018). Tato rovnováha může být vychýlena právě podáváním stravy s vysokým obsahem tuků. Laboratorní myši mohou být vhodným modelem pro sledování výše popsaných poruch.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo prokázat, že zvýšení obsahu tuků v porovnání se standardní krmnou dietou, zejména v kombinaci se zvýšeným příjmem sacharidů, povede ke změnám v lipidovém profilu a možnému rozvoji metabolických poruch a zároveň dojde k významným změnám vybraných chovných parametrů laboratorních myší.

Hypotézy:

H1: Zvýšení obsahu tuků, v porovnání se standardní krmnou dietou, zejména v kombinaci se zvýšeným příjmem sacharidů, povede k výrazným změnám v lipidovém profilu a možnému rozvoji metabolických poruch u laboratorních myší.

H2: Zvýšení obsahu tuků, v porovnání se standardní krmnou dietou, zejména v kombinaci se zvýšeným příjmem sacharidů, povede k významným změnám ve vybraných chovných parametrech u laboratorních myší.

3 Literární rešerše

3.1 Myš jako experimentální subjekt

Mus musculus je klasifikována jako sociální druh a podle Kappela a kol. (2017) mají divoké myši složitou sociální organizaci. Jejich teritorium je totiž obýváno pouze jedním dospělým samcem, několika samicemi a jejich potomky. Sociální prostředí může mít mnoho příznivých účinků na komfort zvířat, ale může být také významným zdrojem sociálních stresorů. Volně žijící myši mají tendenci vytvářet despoticke sociální systémy, kde přítomnost jiného samce není dominantním jedincem akceptována.

Gaskill a kol. (2013) uvádí, že velikost teritoria je závislá na dostupnosti potravin a hustotě populace. Rozsahy teritorií se pohybují od několika metrů čtverečních v oblasti kolem lidských obydlí (např. farmy, budovy, obchody s potravinami), až po kolonie s několika kilometry čtverečními v přírodních stanovištích, která nejsou obývána lidmi. Sexuálně dospělí samci jsou buď rozptýleni, nebo zůstávají, aby zdědili rodičovské území. Je to odvozeno od hustoty populace, velikosti a agresivity každého mladého samce. Menší samci jsou obvykle rozptýleni a často se stanou neteritoriálními. Komunikace prostřednictvím pachových podnětů uložených v životním prostředí je obzvláště důležitá při udržování sociálních systémů, které zvířatům umožňují rozpoznat jednotlivce, jejich sociální postavení a území, které obývají.

Gaskill a kol. (2013) dále pokračuje, že podle již existujících vědeckých důkazů může být výše uvedené chování stále vrozené, i když jsou laboratorní myši chovány v zajetí po mnoho generací. Díky studiím na domestikovaných druzích bylo prokázáno, že chování divokého typu se za naturalistických podmínek vyjadřuje i nadále. Existují přesvědčivé důkazy, že také přirozené chování myši bylo domestikací zanecháno do značné míry nezměněné. Hnízda jsou používána divokými myšmi k úkrytu před predátory, k ústupu z drsných podmínek prostředí a k ochraně mláďat. Laboratorní myši, i když nebyly po mnoho generací vystaveny divokým podmínkám, jsou vysoce motivovány k budování hnízda, pokud dostanou správné materiály.

Abolins a kol. (2017) uvádí hlavní výhody využívání myši k experimentálním účelům. Jedná se o jejich rychlý růst, časně zrání, vysokou plodnost, docilitu, krátkou graviditu, velký počet potomstva, odolnost, chovatelskou nenáročnost a snadnou genovou manipulaci s genomem.

3.1.1 Manipulace s myšmi

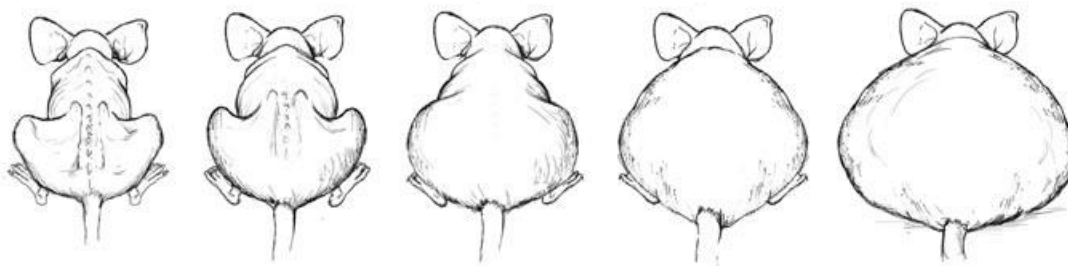
Laboratorní myši jsou podle Burkholder a kol. (2012) obecně hodné a poslušné, ale před osobou, která se je snaží omezit, se začnou pohybovat rychle nebo skákat. Některé kmeny mohou vykazovat obrannou agresivitu.

Burkholder a kol. (2012) doporučuje následující postup. Myš je uchopena za zadní část ocasu a umístěna na mřížku s krmivem. Tím je myši umožněno uchopit předními tlapkami tyče mřížky. Velmi obézní nebo březí myši je třeba přidržovat pod břichem, aby bylo těžkému obsahu břicha zabráněno ve stlačení bránice, a tím i v omezení dýchání. Důležité je zachování kontroly nad ocasem, čímž je myši zabráněno v úniku. Po připoutání zvířete k mřížce by mělo být přejížděno prstem po srsti zvířete, aby byly pocitěny rány, které mohou být pokryty kožešinou, a masy, které možná nebyly zřejmé, když se myš pohybovala po kleci. Těžce

dehydrované myši budou slabé a na zadních nohách budou často vykazovat známky paralýzy. Tyto myši mohou mít také potíže s uchopením klecových tyčí předními tlapkami. Mezi další příznaky těžké dehydratace patří propadlé oči a střapatá obličejová srst, která je způsobena piloerekcí. Mírnější dehydrataci lze zjistit sevřením kůže přes lopatky. U dobře hydratované myši se kůže rychle vrátí do původního tvaru. Naopak nahromaděná kůže je známkou dehydratace.

Na obr. 1 je posouzen stav kondice těla u myši přejetím prstu přes sakroiliakální kosti (páteř a kyčelní kosti) a přiřazeny body od 1 do 5. Hodnocení 1 označuje vychudnutí, 5 značí obezitu. U myši s optimální kondicí a tedy s hodnocením 3 jsou kosti hmatatelné, ale ne výrazné (Burkholder a kol. 2012).

Obrázek 1: Stav tělesné kondice (zleva: 1, 2, 3, 4, 5) (Burkholder a kol. 2012)



3.2 Možné vlivy ovlivňující experimentální výsledky

Gordon (2012) říká, že laboratorní myš se ukázala jako nejoblíbenější testovaný subjekt v biomedicinském výzkumu. Hawkins & Golledge (2018) dodávají, že myši jsou široce používány při výzkumu a testování v celé řadě oborů, které zkoumají normální i patologické chování a fyziologii. Gordon (2012) upřesňuje, že myši se používají také jako modely ke studiu obezity, cukrovky, onemocnění CNS a řady dalších patologických stavů.

Beura a kol. (2016) uvádí, že naše současné chápání imunologie bylo do značné míry definováno u laboratorních myší, a to proto, že jsou inbrední, geneticky homogenní a lze s nimi geneticky manipulovat. Umožňují také provádění kinetické tkáňové analýzy od počátku nemoci a použití modelů chorobných onemocnění.

3.2.1 Morfologické, fyziologické a genetické změny u laboratorních myší

Hawkins & Golledge (2018) zdůrazňují, že laboratorní prostředí, ve kterém jsou myši chovány a testovány, se často výrazně liší od jejich životních podmínek ve volné přírodě. Abolins (2017) upřesňuje, že laboratorní myši sice pochází z divokých myší, ale během své laboratorní historie byly podrobeny přísnému výběru, jehož následkem byly pravděpodobně v mnoha ohledech změněny.

Podle Rossharta a kol. (2019) jsou laboratorní myši nápomocny při mnoha důležitých objevech v oblasti imunologie a k pochopení základních biologických jevů. Existují však také rizika, která mohou ovlivnit experimentální výsledky. Komenzální a patogenní repertoár rezidentních mikrobů vyskytujících se ve volné přírodě se v laboratorním prostředí nevyskytuje, což vede k mylným závěrům týkajícím se fungování našeho vlastního „divokého“ imunitního systému. Právě nepřítomnost mikrobů může u myší vést ke změnám ve fungování jejich imunitního systému, čímž dochází k omezené schopnosti předpovídat komplexní imunitní odpovědi lidí. Je prokázáno, že laboratorní myši jsou příliš vzdálené přírodním podmínkám prostředí, než aby věrně zrcadlily fyziologii volně žijících savců (včetně lidí). Savci se svými imunitními systémy vyvinuli tak, aby přežili a prospívali v mikrobiálním světě. V řadě výzkumných prací bylo prokázáno, že reakce laboratorní myši na léčbu určitými léky neodpovídaly reakcím v lidské populaci, zatímco divocí jedinci velmi přesně kopírovali výsledky u lidí. Divocí jedinci tedy lépe rekapituluji například lidské imunitní odpovědi než běžné laboratorní myši.

Beura a kol. (2016) dodává, že laboratorní myši neodrážejí relevantní aspekty lidského imunitního systému, což může být příčinou selhání při převádění léčby na lidi. Laboratorní myši žijí v bariérových zařízeních bez specifických patogenů, tedy v zařízeních SPF (specific pathogen free). Laboratorní myši jsou imunologicky podobné spíše novorozencům, ne však dospělým lidem. Postrádají efektorově diferencované a mukosálně distribuované paměťové T-buňky.

Na druhou stranu Burkholder a kol. (2012) uvádí přesvědčivé protiargumenty. V průběhu let bylo identifikováno několik infekčních agens, které mají nepříznivé účinky na výsledky výzkumu. Z tohoto důvodu je žádoucí udržení chovů v SPF podmínkách a používání sentinelových zvířat.

Abolins a kol. (2017) píše, že laboratorní myši jsou geneticky izolovány od svých volně žijících příbuzných již více než 80 let, takže laboratorní kmeny zachycují pouze malou část genetické variability přítomné ve volně žijících populacích. Genom laboratorní myši je mozaikou genomů *Mus musculus domesticus* a *Mus musculus musculus*. Laboratorní kmeny myši jsou také většinou geneticky homozygotní, což často vede k fenotypům způsobeným recesivními alelami. Ve skutečnosti existují u inbredních myších kmenů velké rozdíly v imunitním fenotypu, ve funkci a rezistenci nebo v náchylnosti k infekčním či zánětlivým onemocněním. Mnoho z těchto rysů bylo identifikováno jako specifická ztráta funkčních mutací v genech, které ovlivňují imunitní odpověď. Odlišné genetické dědictví divokých a laboratorních myši je zřejmé i na základě jiných ukazatelů. Laboratorní myši jsou větší a těžší než divoké a liší se také barvou srsti. Při adaptaci do laboratoře byly myši vybrány pro rychlý růst, časně zrání, vysokou plodnost a docilitu. Neúmyslný výběr imunologických rysů je téměř jistý. Určujícím faktorem pro imunitní funkci je skutečnost, že laboratorní myši obvykle žijí ve vysoce kontrolovaných a optimalizovaných prostředích, mají neomezený přístup k potravinám a jsou drženy bez patogenů. Naproti tomu divoké myši jsou neustále vystaveny environmentálním antigenům, jsou obvykle infikovány četnými mikroparazity a makroparazity a čelí konkurenci o zdroje (například jídlo a bezpečná hnízdiště). Populace divokých myši podléhají neustálému výběru v tomto velmi odlišném antigenním a fyziologickém prostředí, kde imunitní reakce významně přispívají k jejich kondici. Vzhledem k těmto podstatným rozdílům mezi volně žijícími a laboratorními zvířaty a jejich prostředím, se očekávají rozdíly mezi jejich základními imunitními parametry, imunitními odpověďmi na modelové antigeny a funkčními imunitními schopnostmi. Pochopení imunitního fenotypu a funkce u divokých myši je nezbytné pro pochopení imunitních reakcí geneticky rozmanitých, volně žijících populací včetně lidí. Srovnání imunitní funkce divokých a laboratorních myši je také nutné k odhalení užitečnosti či omezení laboratorních myši jako široce použitelných a relevantních imunologických modelů.

Laboratorní myši jsou základem experimentální imunologie a podporují práci, která má transformační účinek na život lidí a zvířat prostřednictvím očkování a v poslední době také imunoterapie. Jak lidská populace stárne, porozumění imunitně zprostředkované nemoci a imunosenescence má stále větší význam. Aby laboratorní myši byly užitečné pro pochopení těchto procesů a aby se léčba a terapie účinně promítly do lidských populací, musíme ocenit jak silné stránky, tak omezení modelu. Vzhledem k tomu, že konečným účelem imunitního systému je poskytnout ochranu před vnějšími environmentálními hrozbami, je pravděpodobné, že prostředí, ve kterém je imunitní systém studován, bude mít hluboké účinky na jeho reakci.

Tabulka 1: Tělesné charakteristiky a koncentrace sérových bílkovin u divokých a laboratorních myší ve stáří 2 měsíců (Abolins a kol. 2017)

Parametr (průměr)	Laboratorní		Divoké	
	Samice	Samec	Samice	Samec
Tělesná hmotnost (g)	20,5	25,75	12,9	13,9
Hmotnost sleziny (mg)	82	76	25	24
Životaschopné buňky sleziny (miliony)	101	119	20,5	20,6
Sérové IgG ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	358	282	6889	5716
Sérové IgE ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,42	0,33	132	81
IgA ve stolici ($\mu\text{g g}^{-1}$)	248	163	199	268
SAP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1,29	0,77	2,06	1,68
Haptoglobin ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,505	0,54	4,87	5,34
AAT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	248	286	272	263

3.2.1.1 Význam sentinelových zvířat

Burkholder a kol. (2012) píše, že pro udržování mikrobiomické čistoty chovu jsou používáni sentinelové. Mnoho mikrobiálních ohnisek je u myší subklinických, a proto je pro detekci a zajištění vhodného zdravotního stavu jednotlivých myší i kolonií nutný mikrobiologický dohled. Sentinelové jsou zvířata, která jsou vystavena špinavé podestýlce koloniálních zvířat. Právě díky tomu je možné určit, zda jsou v koloniích přítomny nežádoucí mikroorganismy. Testování zdravotního dozoru sentinelových nebo koloniálních (nesentinelových) zvířat může zahrnovat stanovení celkové patologie, histopatologie a parazitologie, testování sérologických vzorků na protilátky nebo antigeny, kultivaci nebo izolaci mikroorganismů a molekulární diagnostiku jako je test polymerázové řetězové reakce (PCR).

Burkholder a kol. (2012) dodává, že například odběr vzorku kožešiny pro ektoparazitologickou zkoušku, fekální materiál pro endoparazitologii či pro testování PCR a krev pro sérologické testování mohou být pomocí pro určení zdravotního stavu zvířete.

3.2.2 Vliv sociální dominance

Podle Varholicka a kol. (2018) se myši mohou lišit svým chováním a fyziologií v závislosti na vztazích dominance v dané kleci. Tyto vztahy dominance v experimentech na zvířatech mohou být negativním faktorem, a dominance tak může přispívat k falešným experimentálním výsledkům.

Kappel a kol. (2017) obecně doporučuje skupinové ustájení myší, protože jsou sociálními zvířaty. Ovšem pohlavně dospělí samci vykazují značně teritoriální chování a přirozeně nesdílejí území. Agrese tak může být vážným narušením dobrých životních podmínek zvířat. Mnoho samců může být negativně ovlivněno stresem z opakované sociální porážky a podřízenosti. Sociálně deprivovaní samci vykazovali zvýšenou úzkost a depresivní chování, doprovázené vyššími hladinami kortikosteronu a sníženými hladinami BDNF v mozku (protein zodpovědný za růst a přežití neuronů).

3.2.2.1 Agrese mezi samci

Kappel a kol. (2017) uvádí, že agrese mezi samci v laboratorním prostředí byla spojena s navázáním dominantních vztahů, přičemž velikostí skupiny je ovlivňována míra agrese a stabilita vztahů mezi dominantními a submisivními. Například při počátečním seskupení v malých koloniích tří až pěti samců byla pozorována vysoká míra agrese. Na druhou stranu dominantní samec účinně potlačil boj mezi submisivními. To vedlo k despotické hierarchii (tj. hierarchii s jedním dominantním jedincem), ve které agrese v následujících 21 dnech poklesla. Ve větších skupinách po devíti až dvanácti samcích však mezi submisivními dochází k bojům a časté bývají i změny dominantního postavení.

Soupeření o dominantní postavení a opakované vniknutí do společenských prostorů ostatních proto může obecně představovat neustálé stresory a výzvy jak pro dominantního samce, tak pro submisivní, které budou podstatně častější a intenzivnější než za přírodních podmínek. Nemožnost submisivních uniknout, pokud jsou umístěni v laboratorních podmínkách, je uměle navozenou situací, která se v přírodě obvykle nevyskytuje. Je však dokázáno, že někteří submisivní samci mohou být tolerováni na územích ve volné přírodě. Důvodem může být, že došlo k potlačení jejich chování při označování teritoria dominantním samcem.

Tallent a kol. (2018) říká, že agresivní chování může vyvrcholit zraněním. Intervence obvykle vede k oddělení a izolaci zvířat do individuálních klecí. Jelikož jsou myši společenským druhem, může izolace vést ke stresu a vzniku atypického chování. Kontinuální stres může ovlivnit fyziologii myši, pokud jde o regulaci stresových hormonů a signalizaci hojení ran. Navíc atypické chování a fyziologické změny mohou ovlivnit vědeckou přesnost následný dopad na výzkum je nezanedbatelný. Bailoo a kol. (2018) doplňuje, že abnormální chování je známkou špatného welfare.

Výskyt bojů může být podle Tallenta a kol. (2018) ovlivněn multifaktoriálními složkami, včetně genetického sklonu k agresivitě, zápachu samic, který podporuje konkurenční chování mezi samci, a postupů, které narušují zavedené skupinové struktury. Konkurenční agresivita může být dále vysvětlena narušením pachové komunikace prostřednictvím chovných praktik. Například při čištění klecí jsou zničeny struktury jako jsou hnízda a latríny, a jsou odstraněny pachové stopy zvířat. Čištění klecí bylo identifikováno jako příčina krátkodobého zvýšení agrese u samců. To se zhoršuje přenosem vrhu z původní do čisté klece, protože myši močí na vrh a jejich moč obsahuje hormony, které mohou zvýšit agresivitu. Použitý hnízdící materiál však obsahuje hormony ze žláz v těle (jako jsou plantární žlázy na dolní části nohou), které inhibují agresi, takže přenos hnízdícího materiálu z použité do čisté klece snižuje agresivitu.

Abolins a kol. (2017) uvádí, že agrese jasně vede k vážným sociálním problémům a je kriticky důležitou otázkou. Je však nutné si uvědomit, že submisivita samců má další negativní dopady, a to i při absenci agrese, bojů a zranění. Ve studiích byly vyzkoumány behaviorální rozdíly jako je snížení sociálních interakcí a činností spolu se zvýšením submisivního a obranného chování, spojeného se sociální porážkou a podřízeností. Dále byly vyzkoumány i fyziologické změny, například odlišné imunitní funkce a metabolismus.

Současná literatura naznačuje, že obecně je z hlediska dobrých životních podmínek zvířat vhodnější umisťovat samce ve skupinách. Samci myši jsou schopni vyjádřit řadu sociálních interakcí, které jsou důležitým přirozeným chováním. Je nutné pamatovat, že život se skupinou

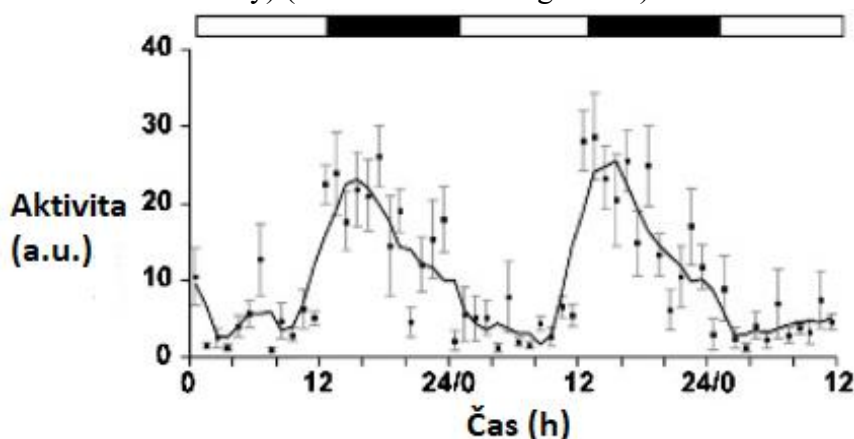
jiných samců není přirozenou situací, a je tedy pravděpodobné, že některým jedincům způsobí významný stres. Nejlepší řešení v dané situaci bude záviset na řadě různých faktorů. Je naznačováno, že skupinové bydlení pro samce je přístup „méně horší“, ale zároveň tato praxe nemůže být zcela podpořena, protože samci by přirozeně raději žili se skupinou samic. (Kappel a kol. 2017)

Tallent a kol. (2018) uvádí, že přidáním domečků do klecí se agrese významně snížila, ale nezmizela.

3.2.3 Vliv světelného režimu

Hawkins & Golledge (2018) konstatují, že v laboratoři je běžné chovat zvířata ve stejných světelných podmínkách, ve kterých žijí lidé. Laboratorní zvířata jsou obvykle chována pod 12hodinovým umělým osvětlením a 12hodinovým temným obdobím. Rutinní chov a experimentální postupy jsou nejčastěji prováděny během dne při umělém osvětlení. Přestože jsou myši noční tvorové, je běžnou praxí provádět chovatelské a vědecké postupy za jasného umělého osvětlení během lidského pracovního dne. Aktivní doba experimentátorů tak odpovídá době odpočinku experimentálních subjektů. To může způsobovat vědecké problémy, protože jak denní doba, tak kvalita světla mohou mít významný vliv na chování a fyziologii hlodavců. Jako noční druh jsou myši neaktivnější během období tmy a vykazují největší nárůst aktivity těsně před nástupem tmy (viz obr. 2). Během neaktivního období jsou divoké myši obvykle skryty před světlem, když se uchylují do nor nebo hnízd. Myši obvykle spí v mnoha krátkých obdobích během 24 hodin, ale během světelného období existuje podstatně více spánkových úseků, a přestože je průměrný úsek krátký, celková doba spánku je podstatně delší než celková doba spánku u lidí (viz tab. 2).

Obrázek 2: Úrovně aktivity u samců myši C57BL/6 po dobu 60 hodin (opakování 12 hodin světla a 12 hodin tmy) (Hawkins & Golledge 2018)



Tabulka 2: Porovnání režimů spánku u člověka a myši (Hawkins & Golledge 2018)

	Člověk – denní	Myš – noční
Primární fáze spánku	Tma (noc)	Světlo (den)
Režim spánku	Mono / dvoufázový	Polyfázový / fragmentovaný
Celková denní doba spánku	7–8 h	12–15 h
Délka úseku spánku	6–8 h	2–4 min

3.3 Vliv výživy na fyziologické funkce u myši

Moderní výrobci krmných diet pro laboratorní zvířata se výrazně snaží o splnění nutričních a energetických požadavků pro jednotlivé druhy zvířat. Přitom je dodržována vysoká úroveň standardizace jednotlivých výrobních šarží tak, aby se zaručilo minimální kolísání nutričních parametrů, a to i po případné sterilizaci krmiva. Tím je dosaženo vysoce standardizovaného procesu ve výživě laboratorních myši. U jednotlivých diet se posuzuje energetická hodnota krmiva, obsah sušiny, stravitelných dusíkatých látek (SNL), bezdusíkatých látek výtažkových (BNLV), tuku, vlákniny, popelovin, dále jednotlivých minerálních látek a vitaminů. Zastoupení jednotlivých složek se může lišit podle daného využití – chovné nebo udržovací diety. Pro experimentální účely jsou široké požadavky na výrazné rozdíly v základním výživovém složení diet (zejména v podílu bílkovin, tuků nebo sacharidů).

Velmi často jsou využívány speciální vysokotučné diety. Např. Speakman (2019) uvádí, že před 22 lety byla vytvořena série 3 diet známých jako série DIO. Ty obsahovaly 4 %, 23 % a 34 % tuku, po přepočtu je to tedy 10%, 45% a 60% podíl metabolizované energie. Normální strava pro hlodavce obsahuje asi 10 % energie ve formě tuku (4 % tuku), takže 45% a 60% strava je pro hlodavce vysoce tučná. Myši na dietě se 45% obsahem energie ve formě tuku se po určitém čase stanou obézními a u myši na dietě s 60 % energie ve formě tuku se tento čas významně zkrátí. To může přinášet určité výhody, neboť se snižuje čas na chov zvířat, a tím i náklady. Mnoho vědců proto používá 60% stravu pro hlodavce z důvodu hospodárnosti. Tato dieta však zcela neodpovídá klasické západní stravě. Typická americká nebo evropská strava totiž obsahuje přibližně 36–40 % tuku, takže přijatelná lidská strava s vysokým obsahem tuku může obsahovat až 50–60 % energie ve formě tuku. Zdá se, že hlavním rozdílem mezi vysokotučnými dietami je to, že čím více tuku dieta obsahuje, tím přehnanější metabolickou reakci způsobuje. Například se zvyšující se tučností v dietě dochází ke zhoršování homeostázy glukózy a inzulínové rezistence.

Speakman (2019) dále uvádí, že pokud nám záleží na tom, aby se strava, kterou krmíme hlodavce, více shodovala s dietami, které konzumují lidé, pak bychom pravděpodobně měli vzít v úvahu nejen procenta tuku ve stravě, ale také složení mastných kyselin (FA). Je dobře známo, že FA mohou ovlivňovat hladinu obezity. Žádná ze sérií DIO z výzkumných diet však nenapodobuje složení FA v lidské stravě. Byly tedy vytvořeny diety, které se liší obsahem makronutrientů. Toto složení bylo přizpůsobeno nasycenému / mononenasycenému / polynenasycenému složení standardní americké stravy. Existuje celkem 30 diet, které pokrývají širokou škálu obsahu makroživin (5–30 % bílkovin, 8,3–80 % tuků a 10–80 % sacharidů, včetně variací od 5 do 30 % sacharózy).

3.3.1 Patofyziologické mechanismy rozvoje metabolických poruch a orgánové dysfunkce

V posledních třech desetiletích významně vzrostla celosvětová prevalence obezity a souvisejících metabolických komplikací jako je cukrovka 2. typu a nealkoholové ztučnění jater, které představují hlavní socioekonomickou zátěž. Proto vzniká rostoucí snaha porozumět

faktorům, které mohou ovlivnit vývoj a progresi metabolického onemocnění (Natividad a kol. 2018).

Podle Světové zdravotnické organizace mělo celosvětově v roce 2016 nadváhu 39 % lidí v dospělém věku a 13 % bylo obézních. To znamená, že obezita se od roku 1975 na celém světě téměř ztrojnásobila, a proto ji lze označit jako rostoucí globální epidemii (Lang a kol. 2019). Perez & DiPatrizio (2018) uvádí, že více než 70 % dospělých ve Spojených státech trpí nadváhou nebo obezitou. Také zdůrazňují, že míra obezity se v posledních několika desetiletích zvýšila u žen v plodném věku a obezita během těhotenství je spojena s abnormálními metabolickými profily u potomků.

Perez & DiPatrizio (2018) dále pokračují, že u myši bylo zjištěno, že západní dieta značně ovlivnila přežití potomků během prvních 6 dní po narození, kdy úmrtnost dosáhla více než 50 %. Mateřská obezita tedy vedla k vysoké míře novorozenecké úmrtnosti a zajímavé je, že přežívali zejména samci.

Jednotlivé patofyziologické projevy při dlouhodobém vysokotukovém a vysokokalorickém příjmu jsou popsány níže.

3.3.1.1 Indukce systémového chronického zánětu dietetickým vysokotukovým příjmem

Guillemot-Legris a kol. (2016) uvádí, že požití vysokotučných diet (HFD) má vliv na rozvoj zánětu v centrální nervové soustavě včetně hypotalamu a v periferních tkání, dále v játrech, tukové tkáni, kosterním svalstvu a ve střevech. Sanmiguel a kol. (2015) udává, že pokud jde o rozvoj chronického systémového zánětu, mohou být první fází změny ve střevní mikroflóře vyvolané HFD a přímé účinky FFA (volné mastné kyseliny) na střevní buňky.

Duan a kol. (2018) uvádí, že jedinci s vysokým bakteriálním bohatstvím byli spojováni s méně významnou adipozitou a zánětem než subjekty s nízkým bakteriálním osídlením střev. Toto je v souladu se zánětem vyvolaným HFD, kdy dochází k poklesu bakteriální rozmanitosti. Zejména po podání HFD byly u lidí i zvířat pozorovány zvýšené hladiny *Firmicutes* a snížené relativní množství *Bacteroidetes*, které způsobovaly zvýšenou střevní propustnost pro endotoxiny (lipopolysacharidy). Kromě toho může zvýšené množství FFA přítomných v HFD přímo působit na střevní buňky. Zvýšené uvolňování lipopolysacharidů a zvýšené hladiny FFA vedly ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů ve střevě. Následuje zvýšený průnik střevních lipopolysacharidů, prozánětlivých cytokinů a FFA do systémového oběhu a portálního oběhu, což vede k systémovému zánětu nízkého stupně. Zvýšené množství FFA a lipopolysacharidů vedlo k aktivaci makrofágů, které opět produkují prozánětlivé cytokiny. Před nástupem obezity tyto faktory v oběhovém systému spouští zánětlivé cesty v mozku. Tím dochází ke snížení centrální citlivosti na leptin a inzulín, což způsobuje zánět v hypotalamu. Aktivované zánětlivé makrofágy v plazmě se mohou dostat do tukové a svalové tkáně, pankreatu a krevních cév, což vede k perifernímu zánětu. Při podávání HFD nedokáže tuková tkáň ukládat přebytečné lipidy, které se poté ukládají do jiných tkání včetně jater, slinivky břišní, kosterního svalstva a krevních cév. Hromadění ektopických lipidů přispívá ke zvyšování koncentrací lipopolysacharidů, FFA, cytokinů a makrofágů, čímž zhoršuje systémový zánět. Játra jsou navíc vystavena relativně vysokým koncentracím lipopolysacharidů, FFA a cytokinů z gastrointestinálního traktu. To vede k hromadění makrofágů v játrech, které přispívá k jaternímu a systémovému zánětu. Zánět související s HFD tedy vede k selhání adipocytů

kvůli účinnému odstranění cirkulujících FFA a podporuje onemocnění jako je cukrovka 2. typu, kardiovaskulární onemocnění, onemocnění jater, ateroskleróza a některé typy nádorových onemocnění.

3.3.1.2 Obezita

Obezita je spojena s poruchou metabolické homeostázy, která vede k inzulínové rezistenci, dyslipidemii (porucha hladiny tuků v krvi), změněné regulaci krevního tlaku a zvýšenému riziku cukrovky, kardiovaskulárních onemocnění, chronických onemocnění ledvin a nádorového onemocnění. Epidemie obezity je důsledkem nerovnováhy příjmu potravy, bazálního metabolismu a výdeje energie, přičemž nejdůležitějšími faktory jsou zvýšený příjem energie nebo snížená fyzická aktivita. Hlavními příčinami celosvětově rostoucí obezity jsou zejména změny ve stravě západního stylu způsobené změnami v dostupnosti, kvalitě, množství a zdrojích konzumovaných potravin. Vzhledem k tomu, že komplikace související s obezitou se obvykle projeví až po desítkách let, jsou pro studium molekulárních aspektů obezity a jejich patofyziologických účinků nezbytné náhradní zvířecí modely, např. hlodavci. Ukázalo se, že myši model C57BL/6J je obzvláště dobrým modelem napodobujícím lidské metabolické poruchy, které jsou pozorovány u obezity. Při krmení *ad libitum* stravou s vysokým obsahem tuku (HFD) se u těchto myší zakládá obezita, hyperinzulinémie, hyperglykémie a hypertenze (Lang a kol. 2019).

U obézních jedinců jsou obvykle pozorovány zvýšené hladiny jaterních enzymů v séru, steatóza jater i zvýšená hladina cholesterolu v játrech. Dále bylo pozorováno významné zvýšení hladiny celkového cholesterolu v krevní plazmě (Natividad a kol. 2018).

Lang a kol. (2019) dále rozvíjí, že obezita je důležitým základním faktorem cévní dysfunkce. Centrální mechanismus cévní dysfunkce se připisuje snížení biologické dostupnosti oxidu dusnatého v endotelu. Nejvýznamnější roli při cévní dysfunkci však hraje zvýšené množství tukové tkáně v okolí cév. Dále je uváděno, že kvůli zvýšené koagulační aktivitě je obezita rizikovým faktorem trombotických poruch a je spojena se zvýšeným rizikem ischemické cévní mozkové příhody, hluboké žilní trombózy a plicní embolie.

3.3.1.3 Inzulínová rezistence a cukrovka 2. typu

Obezita vyvolaná HFD je spojena s inzulínovou rezistencí a dalšími chronickými nemocemi souvisejícími se stravou. Bylo prokázáno, že krmení s vysokým obsahem tuků má u myší za následek významné zvýšení hladiny glukózy a inzulínu v krvi, čímž dochází ke zhoršené glukózové toleranci a zvýšené rezistenci na inzulín. Porucha glukózové tolerance a inzulínové rezistence jsou nejdůležitějšími patologiemi u cukrovky 2. typu a metabolického syndromu. Spolehlivá indukce zhoršené glukózové tolerance je tedy podstatným rysem vysoce kalorických diet používaných ve studiích na zvířatech (Lang a kol. 2019). Yao a kol. (2016) vysvětluje, že inzulínová rezistence je stav, kdy tělo neodpovídá správným způsobem na cirkulující inzulín, což vede ke zhoršené absorpci glukózy v několika tkáních včetně tukové tkáně, jater a svalů.

Vystavení myší HFD často vede k inzulínové rezistenci a dysfunkci β -buněk pankreatu. Ukázalo se, že myši krmené HFD po dobu několika týdnů vykazovaly zvýšenou intoleranci

glukózy a sníženou citlivost na inzulín, což odráží inzulínovou rezistenci. Současné důkazy prokázaly příčinné a korelační vazby mezi zánětem vyvolaným HFD a patogenezí inzulínové rezistence. Sekrece inzulínu z β -buněk a působení periferního inzulínu mohou být ovlivněny hypotalamickým zánětem. Prozánětlivé cytokiny produkované samotnými β -buněkami v důsledku hromadění makrofágů v pankreatu mohou nakonec vést k apoptóze β -buněk a intoleranci glukózy. To vede ke zvýšenému uvolňování inzulínu z β -buněk, a tím k hyperinzulinémii. V tukové tkáni podporuje hyperinzulinémie v kombinaci se zánětlivou odpovědí lipolýzu, což umožňuje průtok FFA a glycerolu do jater a podporuje glukoneogenezi. Zvýšené koncentrace inzulínu současně zvyšují svalovou glykolýzu. Následně zvýšená glukoneogeneze zvyšuje produkci glukózy v játrech, a tím vede k systémové inzulínové rezistenci. V důsledku systémové inzulínové rezistence a relativně snížené sekrece inzulínu z β -buněk pankreatu dochází k cukrovce 2. typu. Nadměrná konzumace HFD tedy vede k rozvoji inzulínové rezistence a cukrovky typu 2 (Duan a kol. 2018).

3.3.1.4 Poruchy centrálního nervového systému

Neurozánět byl pozorován v mozkových strukturách jako je hypotalamus, hipokampus, amygdala, kůra a mozkový kmen. Neurozánět zvyšuje výskyt patologických stavů centrální nervové soustavy jako jsou kognitivní poruchy, abnormality chování (například chování podobné depresi a úzkosti), Alzheimerova choroba (Almeida-Suhett a kol. 2017). Alzheimerova choroba je nejčastější formou demence a je charakterizována přítomností amyloidních plaků, tzn. že se amyloidní bílkoviny ukládají v podobě vláken a poškozují nervové buňky a jejich spoje. Tyto změny byly doprovázeny zánětlivými a stresovými odpověďmi mozku (Kothari a kol. 2017).

Kothari a kol. (2017) udává, že při zkrmování HFD myši vykazovaly pozměněnou mozkovou inzulínovou signalizaci a kognitivní funkce jako je paměť, pozornost atd. Navíc Busquets a kol. (2017) prokázal, že i bez projevů obezity mohou HFD prostřednictvím změn ve střevní mikroflóře zhoršit paměť a zvýšit úzkost a stereotypní chování u myši. Freeman a kol. (2013) uvádí, že změny kognitivních funkcí mohou být spojeny s oxidačním stresem v mozku. Celkové hladiny reaktivních forem kyslíku byly významně zvýšeny u myši krměných HFD ve srovnání s myši krměnými kontrolní stravou.

Duan a kol. (2018) říká, že příjem HFD vede k periferní inzulínové rezistenci a obezitě. Periferní hyperinzulinémie vyvolaná HFD tedy může z počátku do určité míry vyvolat nedostatek inzulínu v mozku, což vede k nižší tvorbě enzymu degradujícího inzulínu a tím tedy k jeho nižší degradaci. Také oxidační stres přispívá ke zhoršené inzulínové signalizaci. Tyto faktory tedy vedou k inzulínové rezistenci, což může být jeden z důvodů vzniku Alzheimerovy choroby.

3.3.1.5 Vliv na kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární onemocnění jsou srdeční a cévní choroby. Patří sem ischemická choroba srdeční a ischemická choroba cév dolních končetin, vysoký krevní tlak (hypertenze) a cévní mozková příhoda. Jedná se o nejčastější příčinu smrti v západních zemích. Příčinou kardiovaskulárních onemocnění je primárně poškození cév aterosklerózou, Jedná se o kornatění

tepen, které vzniká v důsledku ukládání tuků do stěny tepny, tzn. vznik aterosklerózy (Erizon a Karani 2020).

Myši na HFD vykazovaly zvýšenou viscerální a subkutánní adipozitu. Bylo zjištěno, že příjem HFD zvyšuje krevní tlak a vede k srdeční aktivaci systému renin-angiotensin-aldosteron, ve kterém angiotensin stimuluje hypertrofii buněk kardiomyocytů a hladkého svalstva (Pereira-Silva a kol. 2019).

Nízký systémový zánět, související s ukládáním tuků v cévách, vedl k endoteliální dysfunkci a k následnému vzniku či šíření kardiovaskulárních onemocnění. Velkou roli u kardiovaskulárních onemocnění hraje také oxid dusnatý. Oxid dusnatý produkovaný v červených krvinkách může přispívat k potlačení agregace krevních destiček, čímž reguluje cévní homeostázu. Snížení biologické dostupnosti oxidu dusnatého tedy podporuje kardiovaskulární onemocnění. Nedostatek oxidu dusnatého tedy negativně ovlivňuje správné fungování cévního endotelu. (Duan a kol. 2018).

Společně s endoteliální dysfunkcí dochází také k dysfunkci červených krvinek během obezity vyvolané HFD a může přispívat k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Kromě toho červené krvinky myši krmených HFD vykazovaly zvýšený obsah cholesterolu. To bylo doprovázeno zvýšenou fagocytózou červených krvinek makrofágy, která může vést k ateroskleróze (Unruh a kol. 2015).

3.3.1.6 Střevní nemoci

Vysokotučnou dietou způsobený střevní zánět přispívá nejen k systémovému zánětu nízkého stupně, ale také k lokalizované tkáňové dysfunkci. Například krmení HFD může zvýšením prozánětlivých cytokinů způsobit poškození tkáně sliznice a způsobit ileitidu (zánětlivé onemocnění poslední části tenkého střeva) a kolitidu (zánětlivé onemocnění tlustého střeva a konečníku). HFD tedy zvyšuje riziko zánětlivých onemocnění střev. Zvýšený výskyt zánětlivých onemocnění ve vyspělých zemích odpovídá rostoucí spotřebě tuku. HFD jsou podporovány střevní záněty a poruchy mikrobiomu. Ukázalo se, že HFD zvyšuje střevní propustnost, podporuje dysbiózu (nerovnováha mezi prospěšnými a škodlivými bakteriemi) střevní sliznice a mění složení mikroflóry s profilem charakterizovaným expanzí prozánětlivých bakterií *Firmicutes* a *Proteobacteria* a redukcí ochranných bakterií, jako jsou *Bacteroidetes*. Navíc po střevním zánětu dochází u obezity vyvolané HFD k morfologickým a funkčním změnám ve střevním nervovém systému, což přispívá k patofyziologii abnormalit trávicího systému (Duan a kol. 2018).

Natividad a kol. (2018) uvádí, že HFD zvyšuje výskyt bakterie *Bilophila wadsworthia*, která se podílí na zvýšené závažnosti kolitidy. Dále tato bakterie zvyšuje některé škodlivé metabolické účinky změnou funkčního potenciálu střevních mikrobů, podporou vyšší střevní propustnosti, rozvojem zvýšené imunitní odpovědi nejen na střevní sliznici, ale i celkově v organismu a nepřiměřené koncentrace žlučových kyselin. Důležité je také odhalit, že *Bilophila wadsworthia*, nezávisle na svých prozánětlivých vlastnostech, má schopnost negativně ovlivňovat glukózu a jaterní homeostázu. Vysoký výskyt *Bilophila* zvyšuje náchylnost k zánětlivým i metabolickým chorobám.

3.3.1.7 Osteoporóza

Osteoblasty a adipocyty pocházejí ze stejného zdroje mezenchymálních kmenových buněk (MSC), což vede k interakcím mezi osteoklastogenezí a adipogenezí, které mohou být ovlivněny příjmem tuku v potravě. Epidemiologické důkazy naznačují, že konzumace HFD podporuje obezitu, která úzce souvisí s nižší kostní minerální hustotou a vyšším rizikem osteoporotických zlomenin (Duan a kol. 2018).

Xiao a kol. (2011) a Cao a kol. (2009) se ve svých výzkumech shodují, že myši, kterým byla podávána HFD měly nižší kostní hmotu. Tian a kol. (2018) udává, že krátkodobá konzumace (8 týdnů) HFD zvýšila kostní hmotu, avšak dlouhodobá konzumace (16 až 24 týdnů) HFD již vedla ke snižování kostní hmoty. Duan a kol. (2018) dodává, že je pravděpodobné, že HFD zpočátku zvyšují ukládání kostí kvůli zvýšené mechanické potřebě, ale nakonec zhoršují tvorbu a obrat kostí v důsledku metabolické dysregulace. Kromě toho může HFD také regulovat ukládání kostní hmoty prostřednictvím hormonu leptinu vylučovaného adipozitou vyvolanou HFD.

3.3.1.8 Chronická onemocnění ledvin

Chronické onemocnění ledvin je definováno přetrvávajícími abnormalitami moči, strukturálními abnormalitami nebo poruchou vylučovací funkce ledvin, což naznačuje ztrátu funkčních nefronů. Když se u lidí rozvine chronické onemocnění ledvin (CKD), jejich ledviny se poškodí a přestanou čistit krev. Pokud ledviny nefungují dobře, hromadí se v těle toxický odpad a nadbytečná tekutina, což může vést k vysokému krevnímu tlaku, srdečním onemocněním, mozkové mrtvici a předčasné smrti. Cukrovka 2. typu a obezita jsou hlavními příčinami tohoto onemocnění (Romagnani a kol. 2017).

Silná souvislost mezi příjmem nasycených mastných kyselin (SFA) a dysfunkcí ledvin byla pozorována v průřezové studii zahrnující více než 19 000 dospělých lidí ve věku více než 45 let (Lin a kol. 2010).

3.3.1.9 Nádorová onemocnění

Současným západním životním stylem je zvyšováno riziko tukových onemocnění jater. Nealkoholická steatohepatitida (stav, kdy tuk v játrech přesáhne 5 %) se může vyvinout z tukového onemocnění jater (steatóza) a může vést k fibróze, cirhóze a dokonce k hepatocelulárnímu karcinomu (maligní nádor jater) (Bhattacharjee a kol. 2017).

Lidská tuková tkáň prsu, heterogenní buněčná populace, se skládá z multipotentních mezenchymálních kmenových buněk, zralých bílých adipocytů, progenitorových buněk, imunitních buněk, endotelových buněk a fibroblastů. Pod vlivem vnější stimulace se tyto multipotentní mezenchymální kmenové buňky mohou diferencovat na různé buněčné typy, jako jsou adipocyty, fibroblasty a myofibroblasty. Bylo zjištěno, že obezita může podporovat diferenciaci myofibroblastů v tukové tkáni mléčné žlázy, což přispívá k fibróze a progresi nádorového onemocnění prsu (Duan a kol. 2018).

Ukázalo se, že dietní tuk je kritickým rizikovým faktorem pro nádorové onemocnění žaludku, což je zhoubný nádor, který vznikl z žaludeční sliznice epitelálních buněk. V prekancerózní žaludeční sliznici bylo dosaženo ukládání tuku u myši vystavených HFD.

Hromadění ektopického tuku poté vedla k narušení homeostázy organel v žaludeční sliznici HFD a dysregulace těchto organel propůjčila žaludeční sliznici vlastnosti podobné nádorovým kmenovým buňkám (Duan a kol. 2018).

Také se ukázalo, že HFD mohou podporovat vznik střevního nádoru bez přítomnosti obezity, ale na základě výrazných změn ve střevních bakteriálních komunitách (Schulz a kol. 2014).

Sledováním a modelováním vysokotukového a vysokokalorického příjmu na experimentálních modelech nám může poskytnout potřebné znalosti patofyziologických mechanismů, které se rovněž uplatňují v rozvoji civilizačních poruch a metabolických onemocnění v lidské populaci.

3.4 Vliv nasycenosti vazeb a délky řetězců mastných kyselin na metabolismus

Mastné kyseliny můžeme popsat jako karboxylové kyseliny, které obsahují 4-26 uhlíků. Většinou mají sudý počet uhlíkových atomů, protože se syntetizují z dvouuhlíkatých jednotek. Existují volné mastné kyseliny (FFA), nebo kyseliny, které jsou součástí lipidů (ve formě esterů s alkoholy – glycerolem nebo cholesterolem). Mastné kyseliny jsou amfipatické, to znamená, že jejich hydrofilní (polární) část reaguje s molekulami vody, ale jejich nepolární část je hydrofobní. K jejich popisu se používají zkrácené zápisy (např. C12:0), které se skládají z několika čísel. Prvním číslem zjistíme počet uhlíkových atomů, druhé číslo (za dvojtečkou) udává počet dvojných vazeb (Matouš a kol. 2010).

Mastné kyseliny rozdělujeme na nasycené a nenasycené, záleží na přítomnosti dvojně vazby. Nasycené mastné kyseliny nemají dvojnou vazbu, mezi nejznámější patří kyselina laurová (C12:0), myristová (C14:0), palmitová (C16:0) a stearová (C18:0). Nasycené mastné kyseliny se v lidském organismu mohou chovat různě, proto by neměly být zařazovány do jediné skupiny. Mastné kyseliny, které obsahují nízký počet atomů uhlíku v molekule (4-10) se jednoduše vstřebávají stěnou ve střevě, ale nemohou se z nich tvořit tuky stejně jako z vyšších nasycených kyselin. Namísto toho přechází do jater, kde se přemění (při tvorbě vysoké energie) na oxid uhličitý a vodu. Druhá skupina mastných kyselin, která obsahuje 12-16 atomů uhlíku v molekule, je zastoupena v kokosovém oleji a v mléčném tuku. Kyselinu palmitovou je možné v malém množství nalézt v každém tuku a oleji, ve větším množství se objevuje v živočišných tucích a v palmovém oleji. Když se tyto kyseliny vstřebávají, mohou působit na organismus celkem nepříznivě, neboť zvyšují hladinu celkového cholesterolu v krevní plazmě. To pak je pro člověka rizikové, neboť to může způsobovat nemoci krevního oběhu. Zrychlují totiž tvorbu cholesterolu, který je vázán v LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou). Proto by měl být příjem mastných kyselin z této skupiny omezován. Od výše popsaných mastných kyselin se odlišuje kyselina stearová (C18:0), která se vyskytuje zejména v hovězím loji. Kyselina stearová totiž nezvyšuje hladinu cholesterolu, ovlivňuje tedy příznivě lipoproteinové frakce LDL (Pokorný 2006).

Nenasycené mastné kyseliny je možné navíc rozdělit také podle počtu dvojných vazeb na mononenasycené a polynenasycené. Mononenasycené mastné kyseliny mají pouze jednu dvojnou vazbu a jejich nejvýznamnější zástupce je kyselina olejová (C18:1). Tyto kyseliny snižují hladinu celkového a LDL cholesterolu v krevní plazmě (Matouš a kol. 2010).

Polynenasycené mastné kyseliny se skládají ze dvou nebo více dvojných vazeb. Tyto mastné kyseliny se dělí na skupiny omega-6 a omega-3. Tyto čísla ukazují, na kterém místě se nachází poslední dvojná vazba, resp. vazba nejvzdálenější od karboxylové skupiny (Matouš a kol. 2010).

Ve skupině omega-6 jsou nejznámějšími zástupci kyselina linolová (C18:2), kyselina γ -linolenová (C18:3) a kyselina arachidonová (C20:4). Velmi významně snižují hladinu celkového a LDL cholesterolu v krevní plazmě, avšak při vyšším příjmu také snižují i hladinu HDL cholesterolu v krevní plazmě. Nevýhodou je, že tyto kyseliny snadno podlehnou změnám v oxidaci a mohou působit prozánětlivě (Matouš a kol. 2010).

Ve skupině omega-3 je nejznámější zástupce kyselina α -linolenová (C18:3). Tato kyselina ovlivňuje s příznivým účinkem průběh kardiovaskulárních chorob. Dále působí na organismus tak, že snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění a působí protizánětlivě (Matouš a kol. 2010).

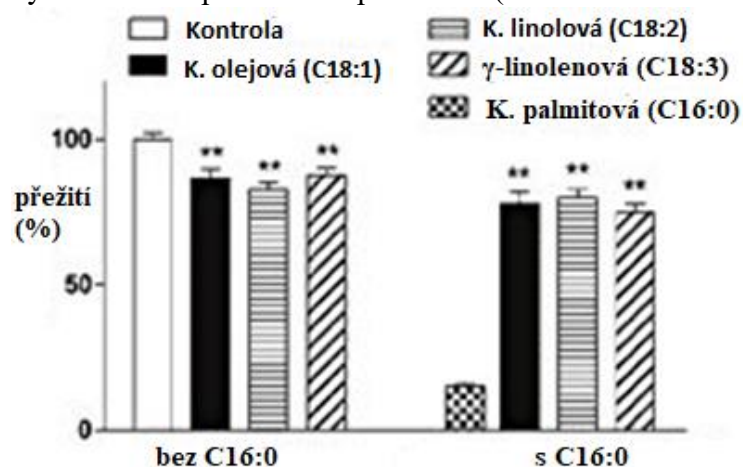
Tabulka 3: Zastoupení dle nasycenosti vazeb mastných kyselin v tuku v různých zdrojích (upraveno dle Matouš a kol. 2010).

Zdroj tuku	Zastoupení dle nasycenosti vazeb mastných kyselin v tuku (%)		
	Nasycené	Mononenasycené	Polynenasycené
Sójový olej	16	25	59
Vepřové sádlo	39	47	14
Palmový olej	50	40	10
Hovězí lůj	56	40	4
Máslo	65	31	4
Kokosový olej	92	6	2

Gehrman a kol (2015) ve svém výzkumu zjistil, že zvýšené hladiny nasycených mastných kyselin (SFA) způsobují dysfunkci a apoptózu β -buněk pankreatu, což je jev známý jako lipotoxicita a souvisí s cukrovkou typu 2. Kyselina palmitová, fyziologicky nejhojnější nasycená SFA, měla silný cytotoxický účinek na pankreatické β -buňky produkující inzulín. Nenasycené mastné kyseliny vykazovaly pouze malý toxický účinek, zejména chránily před toxicitou kyseliny palmitové (viz obr. 3).

Elsner a kol. (2011) doplňuje, že o toxicitě SFA rozhoduje také délka řetězce, delší řetězec znamená vyšší toxicitu. Kyselina stearová byla nejtoxičtější, za ní následovala kyselina palmitová a toxicita kyseliny laurové již byla zanedbatelná.

Obrázek 3: Životaschopnost pankreatických β -buněk při působení nenasycených mastných kyselin bez / s přidáním k. palmitové (Gehrmann a kol. 2015).



Obezita a inzulínová rezistence jsou spojeny zejména se zvýšenými plazmatickými hladinami volných nasycených mastných kyselin a triglyceridů. Je prokázáno, že nadměrné

množství nasycených mastných kyselin podporuje vznik prozánětlivých cytokinů, zhoršuje signalizaci inzulínu a stimuluje apoptózu (Leamy a kol. 2013)

3.5 Důležitost celkového cholesterolu a triglyceridů

Cholesterol je amfipatickou sloučeninou, což znamená že má polární i nepolární část. Polární část reprezentuje hydroxylová skupina, díky níž se molekula dokáže rozpouštět ve vodě. Nepolární část tvoří steroidní jádro a uhlovodíkový řetězec, které jsou rozpustné v tucích. Cholesterol je nenasycený steroidní alkohol a má nenahraditelnou úlohu ve funkci všech živočišných buněk. Také je jedním ze základních prvků jejich buněčných membrán. Cholesterol je předchůdcem několika významných látek, jako jsou žlučové kyseliny, steroidní hormony nadledvin a gonád, a vitamíny D. Většinu cholesterolu organismus dokáže vyrobit sám, část je obsažena ve stravě. Přijímání cholesterolu ve stravě však může zvyšovat hladinu LDL v krvi, což způsobuje aterosklerózu a následný infarkt myokardu. Zvýšený cholesterol může znamenat vysoké riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Hlavní typy cholesterolu jsou LDL a HDL. LDL má za úkol transport cholesterolu z jater do tkání. Pokud je tohoto cholesterolu v těle příliš, usazuje se v cévách, což vede k ateroskleróze. HDL transportuje cholesterol opačným směrem, tedy z tkání do jater, kde je využíván k tvorbě žlučových kyselin, hormonů, a vitamínu D, který je potřebný pro stavbu kostí. (Lančaričová 2019).

Triglyceridy jsou estery mastných kyselin s glycerolem a jsou hlavní lipidovou složkou tuku v potravinách a tukových zásobách zvířat. Triglyceridy mají vliv na hladinu celkového cholesterolu v krvi. V organismu přenáší tuky ze stravy a zároveň jsou dalším zdrojem energie. Tukové a jaterní buňky syntetizují a ukládají triacylglyceroly. Pokud organismus potřebuje energii, kterou mu mohou vydat mastné kyseliny, pak hormon glukagon vyšle signál lipáze, k zahájení štěpení triacylglycerolů na volné mastné kyseliny. Jelikož triacylglyceroly nemohou volně projít přes membrány buněk, enzymy v cévních stěnách pak rozštěpí triacylglyceroly na volné mastné kyseliny a glycerol. Cílové buňky pak mohou zachytávat mastné kyseliny pomocí přenašeče mastných kyselin. (Soška 2001).

Metabolický syndrom je charakterizován nadměrnou tělesnou hmotností, poruchou homeostázy glukózy, hypertenzí a aterogenní dyslipidemií. Tato kombinace je hlavním rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění a další „typicky západní“ nemoci. K tomuto syndromu dochází zvýšením plazmatické koncentrace TG a LDL a snížením plazmatické koncentrace HDL, této kombinaci se říká „smrtící lipidová triáda“. LDL je náchylný k oxidaci a tím ke strukturální modifikaci. Snadno prochází do subendoteliálního prostoru a může tak podporovat nahromadění tukové hmoty, což může způsobovat lokální zánět a endoteliální dysfunkci. Oxidovaný LDL zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a vyskytuje se ve spojení s vysokými hodnotami TG a nízkými HDL (Ruiz-Núñez a kol. 2016).

4 Metodika

4.1 Postup při vážení myší a odběru krve

Celkem bylo pro tento výzkum použito 41 samců laboratorních myší z kmene C57Bl/6NCrl, kteří byli do svých 3 měsíců na kontrolní (klasické) dietě. Poté byli přestláni do čistých klecí s testovaným (experimentálním) krmivem. Byli zváženi jak jednotliví samci, tak množství zkrmované diety vložené do klecí. Vážení bylo opakováno každý týden po dobu celého experimentu, který probíhal 6 týdnů. K vážení byla použita váha Kern EMB 200-2, na kterou byl připraven žlutý kyblík, do kterého byli postupně vkládáni samci. Po každém použití byl kyblík řádně vyčištěn a vydesinfikován. Dále byly odebrány vzorky jednotlivých diet pro analýzu.

Na konci šestitýdenního experimentu (celkový věk samců byl 4,5 měsíce), byla odebírána krev, resp. došlo k vykrvení. Ihned po vykrvení byla provedena cervikální dislokace (tj. zlomení vazy). Důležité je, aby člověk, který provede cervikální dislokaci, absolvoval školení dle Zákona na ochranu zvířat proti týrání.

Krev byla odebírána do oranžových zkumavek, potažených Lithium/Heparin pro měření biochemických parametrů na biochemickém analyzátoru Beckman Coulter AU450. Pro měření na biochemickém analyzátoru bylo potřebné získat alespoň 300 mikrolitrů krve. Vzorky byly odebírány pomocí skleněných kapilár, které byly předem nalámány na délku přibližně 1 cm. Samotný odběr byl prováděn „čistou“ stranou, tedy tou nezlomenou.

Zkumavky pro odběr krve byly připraveny do stojanu. Pro rozeznání byly označeny lihovou fixou čísla samců. Zároveň byla připravena nádoba na led, kde byly po odebrání zchlazovány zkumavky se vzorky. Myši byly umístěny do anestetické komory a poté byly uspány plynným anestetikem (tj. isofluranem) pomocí inhalační anestezie anestetickou jednotkou UNIVENTOR 410. Správné uspání bylo vyhodnoceno tehdy, když myš nereagovala na žádné podněty a zpomalilo se její dýchání.

Při samotném odběru krve byla pomocí skleněné kapiláry odebrána krev z laterálního koutku oka do zkumavky. Zkumavka byla zavřena a následně promíchána pomalým otáčením nahoru a dolů. Zkumavka byla postavena na 10 minut na stůl při pokojové teplotě, aby nedošlo k příliš rychlému zchlazení, následně byla vložena do připravené nádoby s ledem, kde byla ponechána minimálně 10 minut a maximálně 2 hodiny.

Poté byly zkumavky stočeny v centrifuze Eppendorf 5424 R, při relativní centrifugační síle 5000 g a při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Tím byl oddělen supernatant (tj. krevní plazma) a následně byl odebrán do čisté zkumavky. Z takto získané plazmy byly změřeny hladiny LDL, HDL, TG a celkový cholesterol v biochemickém analyzátoru Beckman Coulter AU480. Ještě před samotným měřením bylo 20 µl uloženo do teploty -80 °C pro pozdější měření lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

4.2 Postup při extrakci lipidů

Pomůcky potřebné pro extrakci lipidů: ledově studený MeOH (methanol) se standardem, který obsahoval izotopicky značené zástupce lipidů pro měření třídy lipidů, dále ledově studený MTBE (Methyl-terc. butyl éter), předchlazené ocelové kuličky na -20 °C, led, vialky Eppendorf 2 ml, pipeta a špičky, analytické váhy, homogenizátor TissueLyser, rotátor, centrifuga.

4.2.1 Extrakce lipidů z plazmy

Zpracování plazmy probíhalo postupně v jednotlivých krocích následujícím způsobem.

1. Pipetou byl do nové zkumavky nabráno 20 μ l plazmy a přidáno 225 μ l ledově studeného MeOH se standardem.
2. Bylo vortexováno 10 vteřin kvůli dostatečnému promíchání.
3. Bylo přidáno 750 μ l ledově studeného MTBE.
4. Opět bylo vortexováno 10 vteřin.
5. Bylo inkubováno na rotátoru 20 minut.
6. Bylo přidáno 188 μ l destilované vody.
7. Vortexováno 20 vteřin a následně bylo inkubováno 5 min.
8. Pro oddělení fází bylo centrifugováno 2 minuty při relativní centrifugační síle 14 000 g a teplotě 4 °C.
9. Pipetou bylo odebráno 700 μ l horní (organické) fáze. Bylo odebráno 200 μ l pro okamžité zpracování a zbylých 500 μ l bylo zmrazeno při -80 °C.

Dále byl vzorek převeden do rozpouštědla vhodnějšího pro MS. Proto se pokračovalo následujícím způsobem.

1. 200 μ l organické fáze extraktu plazmy bylo vysušeno v N₂ koncentrátoru „Digital dry bath“ při nastavené teplotě na 45 °C.
2. Dále bylo do vysušeného vzorku ve zkumavce přidáno 100 μ l směsi MeOH a toluenu v poměru 9:1.
3. Následně bylo 1 minutu vortexováno.
4. Bylo centrifugováno 5 minut při relativní centrifugační síle 18 000 g a teplotě 4 °C.
5. Poté byla část odebrána do mikrozkušavky se skleněným insertem.
6. Takto připravená mikrozkušavka byla vložena do hmotnostního spektrometru Agilent Q-TOF LC/MS 6545 k samotnému měření.

4.2.2 Extrakce lipidů z krmiva

Zpracování vzorků krmiva během první fáze (extrakce do roztoku) probíhalo odlišným způsobem proti vzorkům plazmy.

1. Na analytické váze bylo naváženo 5 mg diety.
2. Do každé zkumavky bylo přidáno 345 μ l ledově studeného MeOH s vnitřním standardem.
3. Také do každé zkumavky bylo přidáno 1150 μ l ledově studeného MTBE a předchlazená kulička z nerezové oceli.

4. Vzorek byl vysokorychlostně protřepán v homogenizátoru TissueLyser II (2 x 30 s, 30 Hz), dokud nebyly viditelné žádné velké částice.
5. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě na rotátoru po dobu 60 minut.
6. Bylo přidáno 300 μ l destilované vody a bylo vortexováno 20 vteřin.
7. Dále bylo centrifugováno 5 minut při 14 000 g, 4 °C.
8. Byl odebrán 1 ml horní organické fáze.

Poté zpracování vzorků plazmy a krmiva probíhalo stejným způsobem, kromě množství použité organické fáze. Cílem bylo také dostat do vzorku rozpouštědlo s lepšími vlastnostmi pro MS.

1. 50 μ l organické fáze extraktu krmiv bylo vysušeno v N₂ koncentrátoru „Digital dry bath“ při nastavené teplotě na 45 ° C.
2. Dále bylo do vysušeného vzorku ve zkumavce přidáno 100 μ l roztoku MeOH a toluenu v poměru 9:1.
3. Následně bylo 1 minutu vortexováno.
4. Bylo centrifugováno 5 minut při relativní centrifugační síle 18 000 g a teplotě 4 °C.
5. Poté byla část odebrána do mikrozkuhavky se skleněným insertem.
6. Takto připravená mikrozkuhavka byla vložena do hmotnostního spektrometru Agilent Q-TOF LC/MS 6545 k samotnému měření.

4.3 Diety

Kpokusu bylo použito 5 druhů experimentálních diet a 1 kontrolní dieta. Výrobem všech experimentálních krmiv je německá firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, sídlem Ferdinand-Gabriel-Weg 16, D-59494 Soest. Výrobem kontrolní diety (n) je německá firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, sídlem Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage. Diety byly podávány ve formě pelet.

4.3.1 Dieta 1 (E15744)

Tato dieta se vyznačuje vysokým obsahem tuku (vepřové sádlo) a vysokou hladinou sacharózy. Používá se proto k vyvolání obezity a metabolického syndromu nebo cukrovky typu 2 u potkanů a myší. Dieta je k dispozici také s hovězím lojem jako zdrojem tuku (více nasycených MK) – dieta 4. Nejvíce zastoupené MK jsou C18:1 (9,42 %), C16:0 (5,33 %), C18:2 (3,46 %) a C18:0 (2,92 %). Ostatních MK obsahuje dieta méně než 1 % (viz tab. 4).

Tabulka 4: Obsah jednotlivých mastných kyselin v dietě 1.

	Mastné kyseliny								
	Nasycené					Mononenasycené		Polynenasycené	
Obsah (%)	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3
	0,05	0,29	5,33	2,92	0,07	0,62	9,42	3,46	0,37

4.3.2 Dieta 2 (E157451)

Tato dieta se vyznačuje především vysokým obsahem škrobu a celkově vysokým obsahem cukrů. Dieta je kromě obsahu cukrů výrazně podobná kontrolní dietě. Nejvíce zastoupené MK jsou C18:2 (1,43 %) a C18:1 (1,30 %). Ostatních MK obsahuje dieta méně než 1 % (viz tab. 5).

Tabulka 5: Obsah jednotlivých mastných kyselin v dietě 2.

	Mastné kyseliny								
	Nasycené					Mononenasycené		Polynenasycené	
Obsah (%)	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3
	0,01	0,04	0,69	0,31	0,02	0,05	1,30	1,43	0,15

4.3.3 Dieta 3 (E15186)

Tato experimentální dieta obsahuje vysoké množství tuků (máslo, kokosový olej, palmový olej, hovězí lůj) s převážně nasycenými mastnými kyselinami. Dieta tedy vyvolá obezitu při zkrmování *ad libitum*. Také to může vést k metabolickému syndromu a cukrovce typu 2. Nejvíce zastoupené MK jsou C18:1 (8,83 %) a C16:0 (8,57 %). Ostatní MK jsou v minoritním množství (viz tab. 6 a 7).

Tabulka 6: Nasycené mastné kyseliny v dietě 3.

	Nasycené mastné kyseliny									
Obsah (%)	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0
	0,12	0,11	0,50	0,45	2,81	1,77	8,57	0,13	2,63	0,07

Tabulka 7: Nenasycené mastné kyseliny v dietě 3.

	Mastné kyseliny					
	Mononenasycené			Polynenasycené		
Obsah (%)	C16:1	C18:1	C20:1	C18:2	C18:3	C20:4
	0,34	8,83	0,01	1,60	0,12	0,02

4.3.4 Dieta 4 (E15746)

Tato dieta se vyznačuje vysokým obsahem tuku (hovězí lůj) a vysokým obsahem sacharózy. Používá se proto k vyvolání obezity a metabolického syndromu nebo cukrovky typu 2 u potkanů a myši. Mastné kyseliny v této stravě jsou více nasycené ve srovnání s ekvivalentní dietou na bázi vepřového sádla – dieta 1. Nejvíce zastoupené MK jsou C18:1 (8,31 %), C16:0 (5,55 %) a C18:0 (4,03 %). Ostatní MK jsou v minoritním množství (viz tab. 8).

Tabulka 8: Obsah jednotlivých mastných kyselin v dietě 4.

	Mastné kyseliny									
	Nasycené						Mononenasyc.		Polynenasyc.	
Obsah (%)	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3
	0,03	0,79	5,55	0,25	4,03	0,03	0,88	8,31	2,07	0,27

4.3.5 Dieta 5 (E15742)

Tato experimentální dieta se vyznačuje extrémně vysokým množstvím tuku a nízkým obsahem cholesterolu. Krmivo rychle vyvolá obezitu a podporuje rozvoj cukrovky typu 2 kvůli vysokému obsahu tuku a nasyceným mastným kyselinám. Nejvíce zastoupené MK jsou C18:1 (13,57 %), C16:0 (7,72 %), C18:2 (4,75 %) a C18:0 (4,34 %). Ostatních MK je v dietě méně než 1 % (viz tab. 9 a 10).

Tabulka 9: Nasycené mastné kyseliny v dietě 5.

Obsah (%)	Nasycené mastné kyseliny					
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0
	0,04	0,07	0,44	7,72	4,34	0,02

Tabulka 10: Nenasycené mastné kyseliny v dietě 5.

Obsah (%)	Mastné kyseliny					
	Mononenasycené			Polynenasycené		
	C16:1	C18:1	C20:1	C18:2	C18:3	C20:4
	0,94	13,57	0,01	4,75	0,51	0,53

4.3.6 Kontrolní dieta (n)

Receptura na bázi obilovin (sója, pšenice, kukuřice), která neobsahuje vojtěšku ani rybí / zvířecí moučku a neobsahuje nitrosaminy. Tato chovná strava byla navržena jako kompletní krmivo pro krmení *ad libitum*, doporučené pro chov dospělých potkanů a myši. Nejvíce zastoupené MK jsou C18:2 (2,20 %) a C18:1 (0,93 %). Ostatní jsou v minimálním množství (viz tab. 11).

Tabulka 11: Obsah jednotlivých mastných kyselin v dietě n.

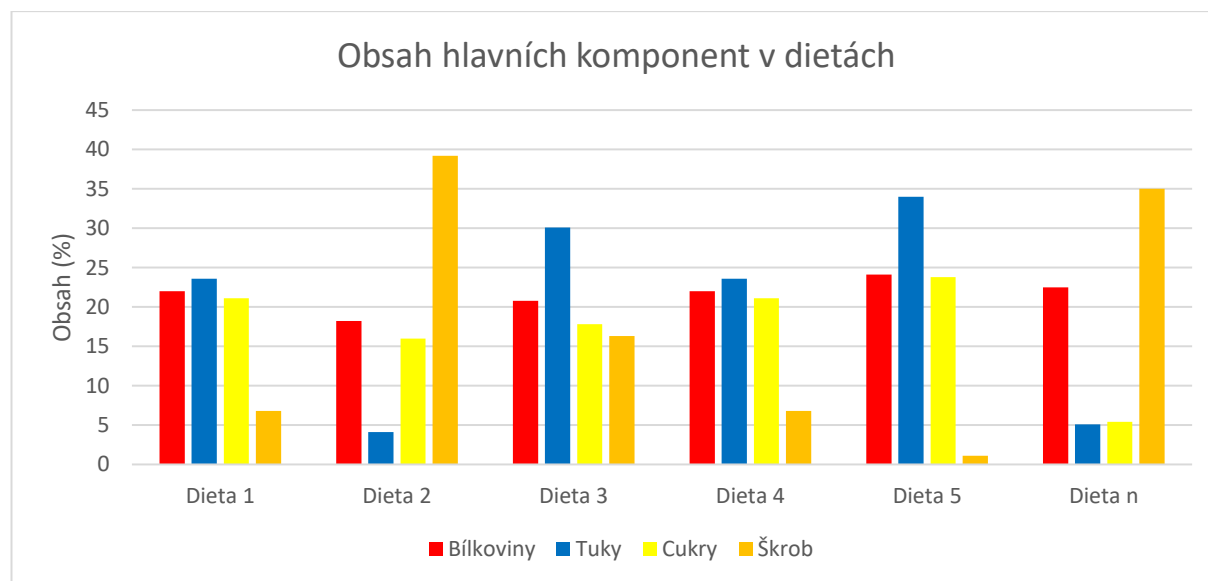
Obsah (%)	Mastné kyseliny						
	Nasycené			Mononasycené		Polynasycené	
	C16:0	C18:0	C20:0	C18:1	C20:1	C18:2	C18:3
	0,53	0,16	0,01	0,93	0,02	2,20	0,30

4.3.7 Porovnání diet

V tabulce 12 a grafu 1 je možné vidět, že dieta 2 má nejnižší a dieta 5 má nejvyšší obsah tuků. Diety jsou rozděleny dle obsahu tuku na vysokotučné 3 a 5 (30,1 a 34,0 %), střednětučné 1 a 4 (obě 23,6 %) a nízkotučné 2 a n (4,1 a 5,1 %). Dále jsou děleny dle obsahu jednoduchých sacharidů na vysokosacharidové 1, 4 a 5 (x, 21,1 a 23,8 %), středněsacharidové 2 a 3 (16,0 a 17,8 %) a nízkosacharidovou n (5,4 %). Vysoký obsah škrobu mají diety 2 a n (39,2 a 35,0 %). Poměrně velký obsah škrobu má také dieta 3 (16,3 %), zatímco dieta 5 ho obsahuje v minimálním množství (1,1 %). Diety 1 a 4 mají stejné obsahy těchto komponent, liší se pouze ve složení MK (viz tab. 12).

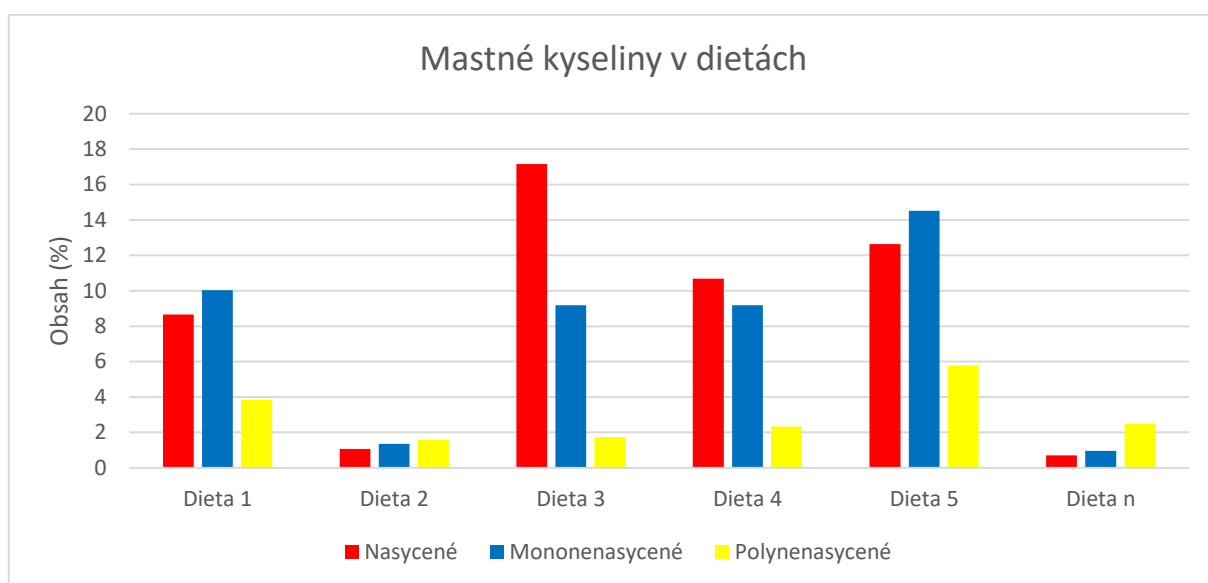
Tabulka 12: Obsah hlavních komponent v dietách (%).

Obsah (%)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta n
Bílkoviny	22,0	18,2	20,8	22,0	24,1	22,5
Tuky	23,6	4,1	30,1	23,6	34,0	5,1
Cukry	21,1	16,0	17,8	21,1	23,8	5,4
Škrob	6,8	39,2	16,3	6,8	1,1	35,0



Graf 1: Obsah hlavních komponent v dietách (%).

V grafu 2 lze vidět, že největší množství nasycených MK mají vysokotučné diety 3 a 5 (17,16 a 12,63 %) a nejnižší zastoupení mají nízko tučné diety 2 a n (1,07 a 0,7 %). Nejvyšší zastoupení mononenasycených MK mají diety 1 a 5 (10,04 a 14,52 %) a nejnižší zastoupení mají diety 2 a n (1,35 a 0,95 %). Nejvyšší zastoupení polynenasycených MK je opět v dietách 1 a 5 (3,83 a 5,79 %). Nejnižší zastoupení mají diety 2 a 3 (1,58 a 1,74 %). Za povšimnutí stojí porovnání diet 1 a 4, kde dieta 4 obsahuje o 2,02 % více nasycených MK. Zatímco dieta 1 má o 0,85 % více mononenasycených MK a o 1,49 % více polynenasycených MK.



Graf 2: Nasycenost vazeb mastných kyselin v dietách (%).

Z tabulky 13 lze vyčíst, že diety 2 a n mají nejvyšší hodnoty poměrů SFA:MUFA (1:1,26 a 1,36) a zároveň mají nejvyšší hodnoty poměrů SFA:PUFA (1:1,48 a 3,57). Nejnížší hodnoty poměru SFA:MUFA mají diety 3 a 4 (1:0,53 a 0,86) a zároveň mají nejnižší hodnoty SFA:PUFA (1:0,10 a 0,22). Zajímavé je, že diety 1 a 5 mají velmi podobné poměry, a to jak SFA:MUFA (1:1,16 a 1,15) tak i SFA:PUFA (1:0,44 a 0,46). SFA představuje nasycené mastné kyseliny, MUFA mononenasycené mastné kyseliny a PUFA polynenasycené mastné kyseliny.

Tabulka 13: Poměr SFA a MUFA a poměr SFA a PUFA, kde SFA představuje hodnotu 1.

	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta n
SFA:MUFA (1:x)	1,16	1,26	0,53	0,86	1,15	1,36
SFA:PUFA (1:x)	0,44	1,48	0,10	0,22	0,46	3,57

4.4 Zpracování dat

Všechna práce s daty z měření biochemie a z hmotnostní spektrometrie, stejně jako statistické výpočty, probíhaly v softwaru Microsoft Excel. Pro statistickou analýzu byly použity tyto statistické metody.

1. Směrodatná odchylka (SD) určuje, jak moc jsou hodnoty rozptýleny či odchýleny od průměru hodnot.
2. Střední chyba průměru je směrodatná odchylka všech možných výběrových průměrů z jedné populace, vypočítaných pro výběry o rozsahu n členů.
3. Variační koeficient je definován jako poměr směrodatné odchylky k průměru, tedy ukazuje rozsah variability ve vztahu k průměru populace.

Data z hmotnostní spektrometrie byla zpracována v softwaru firmy Agilent pro získání plochy pod peakem pro jednotlivé sloučeniny. Data byla následně normalizována pomocí korespondujícího standardu a následně zlogaritmována log o základu 2 a škálována za užití Paretova škálování pro získání relativních hodnot. U krmiv i plazmy byly stanoveny průměry naměřených hodnot. Pro lepší znázornění výsledků z hmotnostní spektrometrie byly použity heatmapy.

5 Výsledky

V této kapitole jsou popsány výsledky výzkumu, který probíhal po dobu šesti týdnů. Každý týden byly zváženy myši, které byly od třetího měsíce svého života krmeny experimentálními dietami, které byly rovněž váženy. Z těchto vah byl vypočítán týdenní přírůstek a zároveň byla zjištěna počáteční a konečná živá hmotnost. Dále byla zjišťována týdenní spotřeba krmiva a konverze krmiva. Pomocí biochemického analyzátoru byl z krevní plazmy naměřen celkový cholesterol, triglyceridy, LDL a HDL. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly z plazmy naměřeny hladiny plazmatických triglyceridů a cholesterol esterů, z diet byly také naměřeny plazmatické triglyceridy.

5.1 Chovné parametry

V tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny výsledky, které popisují průměrné týdenní přírůstky a živé hmotnosti. Lze zde vidět, že samci na velmi tučných dietách (3 a 5) mají jasně největší průměrné týdenní přírůstky 1,34 a 1,42 g. Během šestitýdenního chovu tedy přibrali 8,06 a 8,52 g. Středně a nízkotučné diety společně s kontrolní dietou (1, 2, 4, n) dosahují přibližně 2–3krát menších přírůstků, tedy 0,47–0,60 g. Tyto výsledky jsou znázorněny v grafech 3 a 4.

Průměrné živé hmotnosti mají hodnotu variačního koeficientu většinou do 10 %, tedy 3,08–10,03 %.

Naproti tomu výsledky průměrných týdenních přírůstků dosahují značných hodnot variačního koeficientu, tedy 25,41–50,11 %. To poukazuje na značnou variabilitu jednotlivých hodnot.

Tabulka 1: Průměrné hodnoty týdenní přírůstky samců na jednotlivých dietách.

dieta	počet samců	údaje k týdenním přírůstkům			
		týdenní přírůstek (g)	směrodatná odchyl. (SD)	střední chyba prům. (SEM)	variační koeficient (%)
1	3*	0,47	0,15	0,09	32,48
2	6	0,60	0,30	0,12	50,11
3	6	1,34	0,51	0,21	37,99
4	6	0,56	0,23	0,09	40,57
5	6**	1,42	0,36	0,15	25,41
n	11	0,55	0,16	0,05	29,67

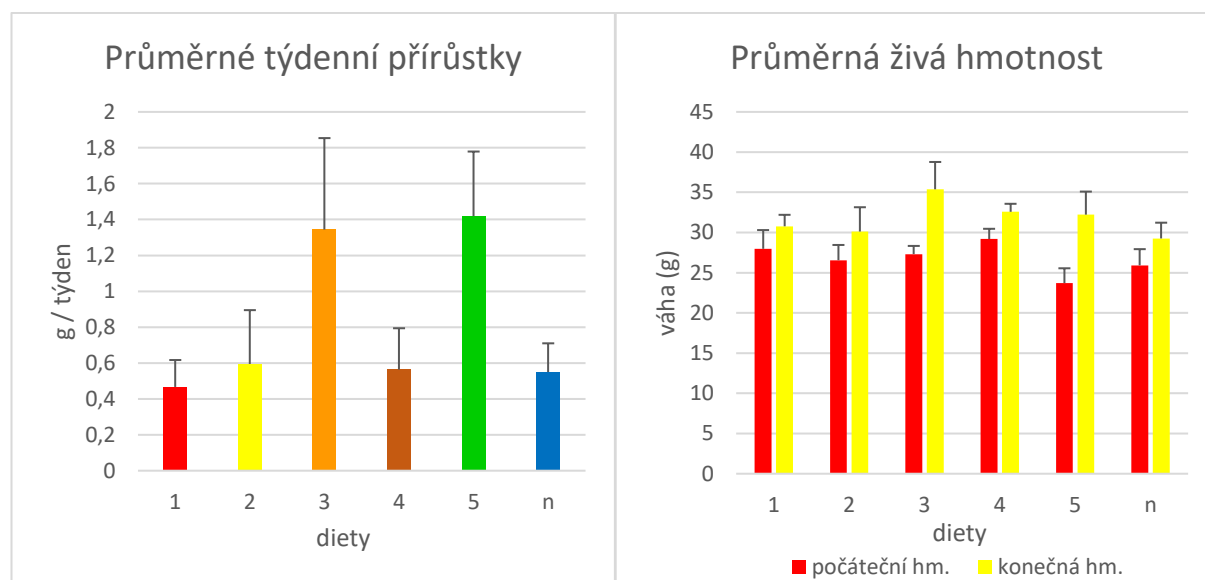
* Samců na této dietě bylo celkem 5, jedna klec se 2 samci však neměla odpovídající výsledky dalším dvěma klecím. Pro přesnost výsledků tedy nejsou započítáni.

** Samců na této dietě bylo celkem 7, jeden však byl výrazně pokousán, a tím došlo k významným změnám ve výsledcích. Je tedy počítáno pouze se zdravými samci.

Tabulka 2: Průměrné hodnoty počátečních a konečných živých hmotností samic na jednotlivých dietách.

dieta	rozdíl mezi koneč. a počát. hm. (g)	údaje k počáteční živé hmotnosti				údaje ke konečné živé hmotnosti			
		počát. živ. hm. (g)	směr. odch. (SD)	stř. chyba prům. (SEM)	variač. koef. (%)	koneč. živ. hm. (g)	směr. odch. (SD)	stř. chyba prům. (SEM)	variač. koef. (%)
1*	2,8	27,97	2,33	1,35	8,33	30,77	1,43	0,83	4,65
2	3,57	26,55	1,90	0,78	7,16	30,12	3,02	1,23	10,03
3	8,06	27,31	1,02	0,42	3,74	35,37	3,40	1,39	9,61
4	3,38	29,19	1,27	0,52	4,36	32,57	1,00	0,41	3,08
5**	8,52	23,7	1,85	0,76	7,81	32,22	2,87	1,17	8,92
n	3,35	25,91	2,02	0,61	7,79	29,26	1,96	0,59	6,71

* a ** viz vysvětlivky k tabulce 1



Grafy 3 a 4: Průměrné týdenní přírůstky a průměrná živá hmotnost (úsečka značí SD).

V tabulce 3 je uvedena spotřeba krmiv a jejich konverze. Průměrná týdenní spotřeba krmiva je největší u kontrolní diety n (28,37 g). Zároveň lze z konverze krmiva vyčíst, že se jedná také o nejdietnější krmivo, kdy na 1 g přírůstku bylo průměrně zkonsumováno 66 g. Druhou nejvyšší týdenní spotřebu (22,26 g) a konverzi krmiva (50,17 g) má dieta 1. Průměrná týdenní spotřeba vysokotukové diety (3) patřila k nejmenším, tedy 17,66 g. Ovšem konverze krmiva byla pouhých 10,07 g. Nejmenší spotřebu krmiva vykazovala dieta 4 (15,83 g). Zde však může hrát roli jasně největší variační koeficient, který je 31,90 %. Výsledek může být tedy zkreslený.

U nejužnější diety (5) bohužel nemohlo dojít ke zvážení krmiva, a tedy ani k následným výpočtům. Krmivo je pro svůj obsah tuku měkké a velmi se drolí. Myši tedy krmivo nadrolí a smíchají s podestýlkou. Tento problém se vyskytl i u jedné klece s další vysokotukovou dietou (3), některé hodnoty tedy nemohly být vypočítány.

Variační koeficient je u průměrné týdenní spotřeby kromě zmiňované hodnoty diety 4 (31,90 %) velmi příznivý (<0,001–3,15 %). U konverze krmiv variační koeficient značně kolísá (8,56–50,54 %).

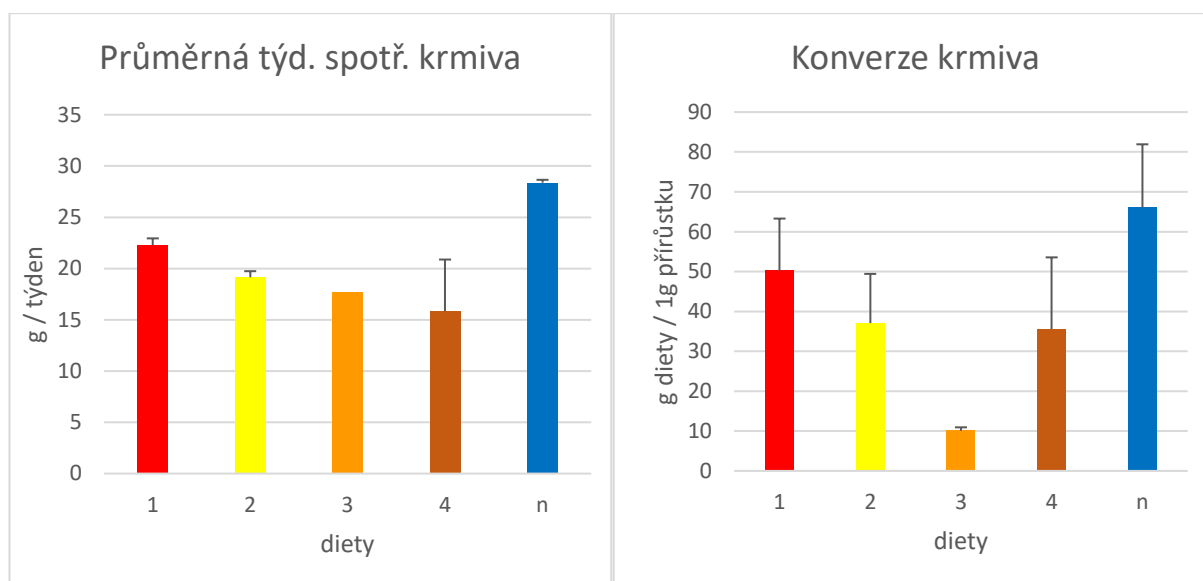
Tabulka 3: Průměrná týdenní spotřeba a konverze krmiva.

dieta	Počet samců	údaje k týdenní spotřebě krmiva				údaje ke konverzi krmiva			
		týden. spotř. krmiva (g)	směr. odchyl. (SD)	stř. chyba prům. (SEM)	variač. koef. (%)	konv. krmiva (g)	směr. odchyl. (SD)	stř. chyba prům. (SEM)	variač. koef. (%)
1	3*	22,26	0,68	0,48	3,05	50,17	13,12	7,58	26,16
2	6	19,14	0,60	0,43	3,15	37,08	12,34	5,04	33,27
3**	6	17,66	x	x	x	10,07	0,86	0,50	8,56
4	6	15,83	5,05	3,57	31,90	35,58	17,98	7,34	50,54
5	6***	x	x	x	x	x	x	x	x
n	11	28,37	0,28	0,20	<0,001	66,00	15,92	7,12	24,12

* Samců na této dietě bylo 5, jedna klec se 2 samci však vůbec neodpovídala výsledkům dalších dvou klecí. Pro přesnost výsledků tedy nejsou započítáni.

** V jedné kleci s touto dietou došlo k rozdrolení krmiva a následnému smíchání s podestýlkou. Některé údaje tedy nemohly být dopočítány.

*** Většina krmiva byla rozdrolena a smíchána s podestýlkou, nemohlo dojít ke zvážení. Samců na této dietě bylo celkem 7, jeden však byl výrazně pokousán, a tím došlo k významným změnám ve výsledcích. Je tedy počítáno pouze se zdravými samci.



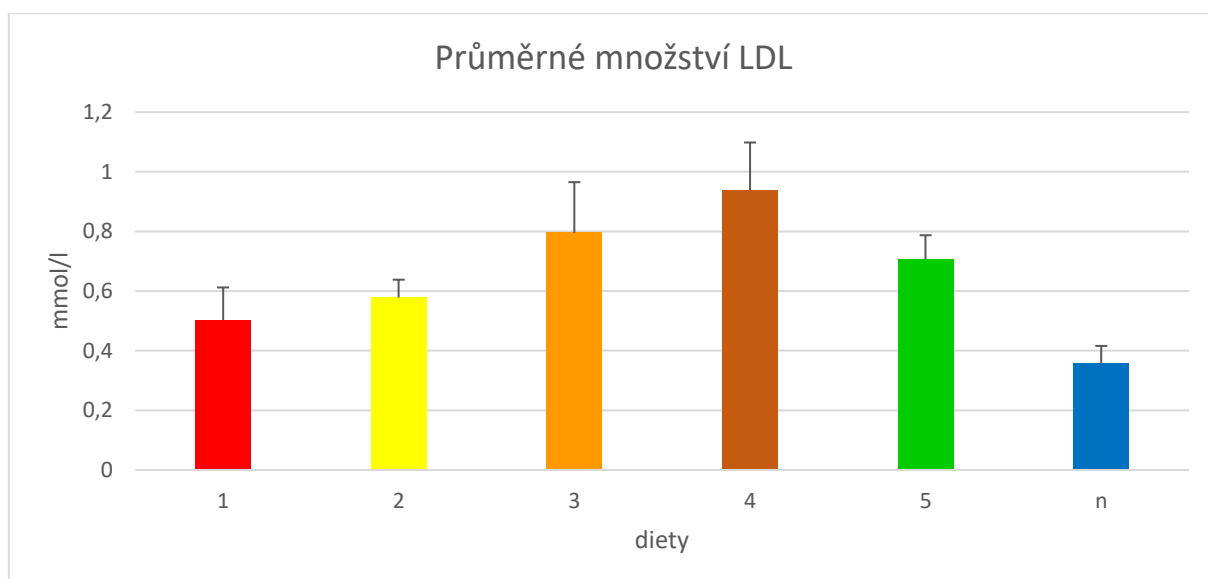
Grafy 5 a 6: Průměrná týdenní spotřeba a konverze krmiva.

5.2 Výsledky biochemické analýzy

Z tabulky 4 a grafu 7 lze vyčíst, že nejnižší hodnoty průměrné hladiny LDL měli samci na dietách 1, 2 a n (0,50, 0,58 a 0,36 mmol/l). Nejvyšší hodnoty průměrné hladiny LDL měli samci na dietách 3, 4 a 5 (0,80, 0,94 a 0,71 mmol/l).

Tabulka 4: Průměrné množství LDL (mmol/l) v krevní plazmě myši.

Dieta	Průměr. množství LDL (mmol/l)	SD	SEM	Variační koef. (%)
1	0,50	0,11	0,05	22,69
2	0,58	0,06	0,02	10,17
3	0,80	0,17	0,07	21,70
4	0,94	0,16	0,07	17,54
5	0,71	0,08	0,03	11,06
n	0,36	0,06	0,02	16,33

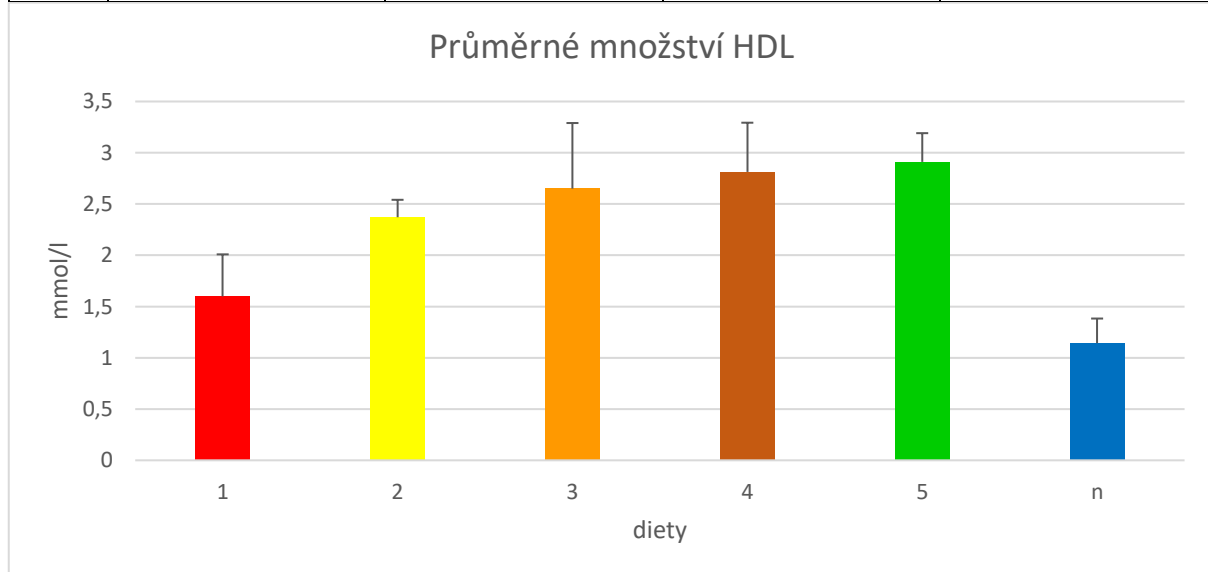


Graf 7: Graficky znázorněné průměrné množství LDL (mmol/l) v krevní plazmě myši.

Z tabulky 5 a grafu 8 lze vyčíst, že nejnižší hodnoty průměrné hladiny HDL měli samci na dietách 1, 2 a n (1,60, 2,37 a 1,14 mmol/l). Nejvyšší hodnoty průměrné hladiny HDL měli samci na dietách 3, 4 a 5 (2,65, 2,81 a 2,91 mmol/l).

Tabulka 5: Průměrné množství HDL (mmol/l) v krevní plazmě myši.

Dieta	Průměr. množství HDL (mmol/l)	SD	SEM	Variační koef. (%)
1	1,60	0,41	0,18	25,59
2	2,37	0,17	0,07	7,38
3	2,65	0,64	0,26	24,11
4	2,81	0,48	0,20	17,03
5	2,91	0,28	0,11	9,46
n	1,14	0,24	0,07	20,56

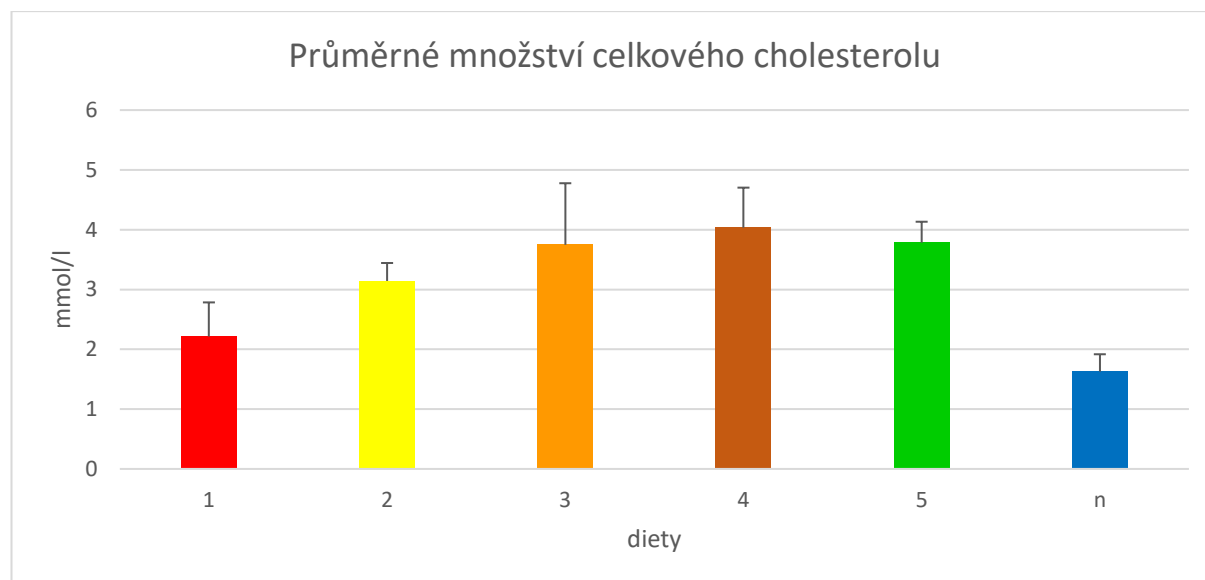


Graf 8: Graficky znázorněné průměrné množství HDL (mmol/l) v krevní plazmě myši.

Z tabulky 6 a grafu 9 lze vyčíst, že nejnižší hodnoty průměrné hladiny celkového cholesterolu měli samci na dietách 1, 2 a n (2,21, 3,14 a 1,63 mmol/l). Nejvyšší hodnoty průměrné hladiny celkového cholesterolu měli samci na dietách 3, 4 a 5 (3,75, 4,03 a 3,78 mmol/l).

Tabulka 6: Průměrné množství celkového cholesterolu (mmol/l) v krevní plazmě myší.

Dieta	Průměr. množství celk. cholesterolu (mmol/l)	SD	SEM	Variační koef. (%)
1	2,21	0,57	0,26	25,81
2	3,14	0,30	0,12	9,58
3	3,75	1,03	0,42	27,60
4	4,03	0,67	0,28	16,71
5	3,78	0,35	0,14	9,14
n	1,63	0,29	0,09	17,62

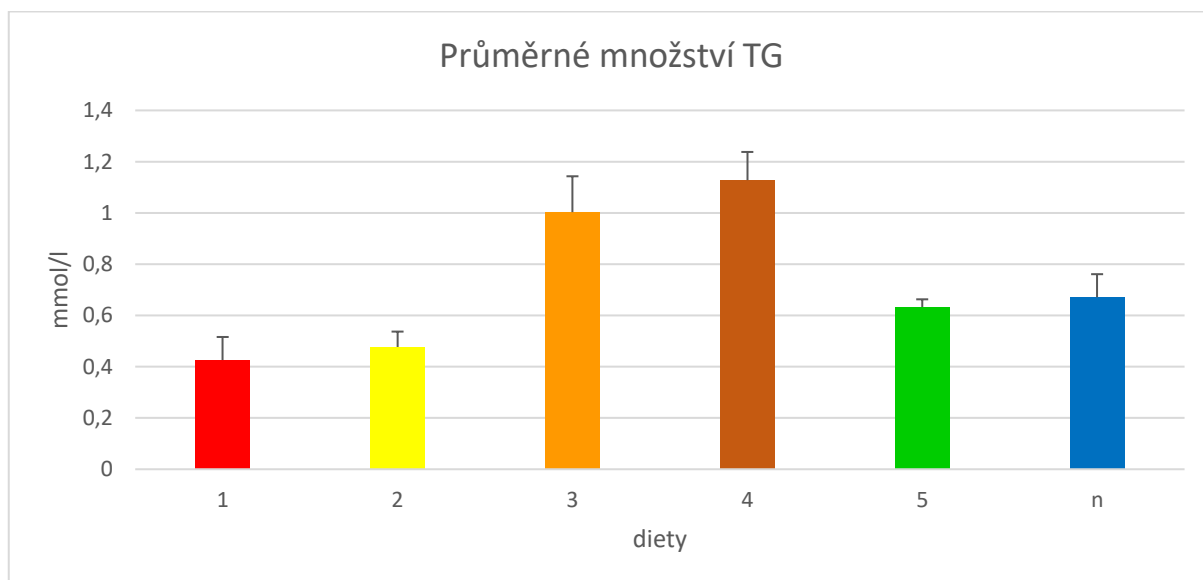


Graf 9: Graficky znázorněné průměrné množství celkového cholesterolu (mmol/l) v krevní plazmě myší.

Z tabulky 7 a grafu 10 lze vyčíst, že nejnižší hodnoty průměrné hladiny triglyceridů měli samci na dietách 1 a 2 (0,43 a 0,48 mmol/l). Nejvyšší hodnoty průměrné hladiny celkového cholesterolu měli samci na dietách 3 a 4 (1,00, a 1,13 mmol/l).

Tabulka 7: Průměrné množství triglyceridů (mmol/l) v krevní plazmě myší.

Dieta	Průměr. množství TG (mmol/l)	SD	SEM	Variační koef. (%)
1	0,43	0,09	0,04	22,07
2	0,48	0,06	0,02	12,13
3	1,00	0,14	0,14	33,96
4	1,13	0,11	0,11	23,73
5	0,63	0,03	0,03	13,39
n	0,67	0,09	0,09	32,35



Graf 10: Graficky znázorněné průměrné množství triglyceridů (mmol/l) v krevní plazmě myší.

5.3 Délka a nasycenost vazeb mastných kyselin v plazmatických triglyceridech a esterech cholesterolů

V této kapitole jsou zahrnuty a popsány výsledky měření plazmy pomocí hmotnostního spektrometru. Pro lepší přehlednost byly použity kombinace tabulek a heatmap. Transformovaná (\log_2) a škálovaná data v tabulkách ukazují, jak se hodnoty liší od průměrné hodnoty dané sloučeniny. Červená barva značí vyšší lipidové zastoupení a modrá barva značí nižší lipidové zastoupení. Jsou seřazeny primárně dle počtu dvojných vazeb a sekundárně dle délky uhlíkatých řetězců.

Z tabulky 8 je zřejmé, že nasycené triglyceridy s krátkými řetězci (které obsahovaly alespoň jednu C12:0 nebo C14:0 mastnou kyselinu) byly v nejvyšším zastoupení u myši na dietě 3, poté následovala dieta 5 a nejnižší zastoupení měly diety 1 a 2. Nejvyšší množství nasycených triglyceridů s dlouhými řetězci (u kterých dosahovaly délky řetězce alespoň C16) obsahovaly, bylo u diety 4, nejnižší množství bylo u diet 2 a n. Celkově nejvyšší množství nasycených triglyceridů měly diety 3 a 4, nejnižší měla dieta 2.

Tabulka 8: Triglyceridy tvořené výlučně nasycenými mastnými kyselinami.

	Dieta					
	1	2	3	4	5	n
TG 12:0_12:0_16:0	-0,45	-0,61	1,80	-0,80	0,22	-0,15
TG 12:0_14:0_16:0	-0,61	-0,76	2,16	-0,84	0,30	-0,22
TG 12:0_16:0_16:0	-0,53	-0,81	2,40	-0,51	0,19	-0,47
TG 14:0_15:0_16:0	-0,26	-0,31	0,37	-0,09	0,13	0,04
TG 14:0_16:0_16:0	-0,52	-0,88	1,92	0,36	0,08	-0,57
TG 15:0_16:0_16:0	-0,41	-0,91	0,10	0,24	0,30	0,30
TG 47:0	-0,66	-0,68	0,53	1,14	-0,13	-0,16
TG 16:0_16:0_16:0	-0,23	-0,92	1,17	0,94	0,29	-0,73
TG 15:0_16:0_18:0	-0,20	-1,05	0,13	1,33	-0,28	0,04
TG 16:0_16:0_17:0	-0,72	-0,82	0,59	1,78	-0,20	-0,39
TG 16:0_16:0_18:0	0,42	-1,01	0,54	1,09	0,62	-0,92
TG 16:0_17:0_18:0	0,09	-1,11	-0,38	1,28	-0,10	0,14
TG 16:0_18:0_18:0	0,74	-0,93	-0,26	0,83	0,62	-0,53
TG 54:0	0,49	-0,63	-0,53	0,73	0,25	-0,15

V tabulce 9 je ukázáno, že mononenasyčené triglyceridy s krátkými řetězci (u kterých byla délka alespoň jednoho řetězce C12 nebo C14) byly v nejvyšším zastoupení u myši na dietě 3 a 4, nejmenší zastoupení měly diety 1, 2 a n. Nejvyšší množství mononenasyčených triglyceridů (u kterých dosahovaly délky řetězce alespoň C16) s dlouhými řetězci bylo u diety 4, následovala dieta 3 a nejnižší množství bylo u diet 1, 2 a n. Celkově nejvyšší množství mononenasyčených triglyceridů měly diety 3 a 4 a nejnižší u diety 1, 2 a n.

Tabulka 9: Triglyceridy tvořené výlučně jednou mononenasyčenou mastnou kyselinou.

	Dieta					
	1	2	3	4	5	n
TG 12:0_12:0_18:1	0,43	-0,30	-0,40	0,24	-0,11	0,13
TG 12:0_16:0_18:1	-0,58	-0,82	2,17	-0,03	0,14	-0,55
TG 15:0_16:0_16:1	-0,38	-0,66	0,16	0,38	0,43	-0,03
TG 14:0_16:0_18:1	-0,67	-0,27	1,45	0,96	-0,01	-0,86
TG 15:0_16:0_18:1	-0,69	-0,93	0,47	1,56	-0,03	-0,27
TG 16:0_16:0_18:1	-0,28	-0,06	0,79	1,09	0,22	-1,00
TG 16:0_17:0_18:1	-0,39	-1,05	0,52	1,99	0,04	-0,64
TG 16:0_18:0_18:1	0,17	-0,77	0,41	1,30	0,78	-1,08
TG 17:0_18:0_18:1	-0,40	-1,13	0,35	2,23	-0,09	-0,56
TG 54:1	0,17	-0,93	0,46	1,67	0,66	-1,15
TG 55:1	-0,49	-0,75	0,35	1,42	-0,43	-0,06

V tabulce 10 je možné vidět, že polynenasycené triglyceridy s menším množstvím dvojných vazeb (mastné kyseliny měli dohromady maximálně tři dvojně vazby) byly v nejvyšším zastoupení u myši na dietě 3 a 4 a nejmenší zastoupení měla dieta 1. Nejvyšší množství polynenasycených triglyceridů s vyšším množstvím dvojných vazeb (mastné kyseliny měli dohromady minimálně čtyři dvojně vazby) bylo jednoznačně u diety n. Celkově nejvyšší množství polynenasycených triglyceridů měly diety 3 a n, nejnižší u diety 1.

Celkově nejvyšší množství triglyceridů je u myši na dietách 3 a 4, celkově nejnižší množství je u myši na dietách 1 a 2.

Tabulka 10: Triglyceridy tvořené s jednou a více mononenasyčenou mastnou kyselinou a s polynenasycenými vazbami mastných kyselin.

	Dieta					
	1	2	3	4	5	n
TG 15:1_16:0_16:1	-0,27	-0,55	-0,25	-0,07	0,50	0,28
TG 16:0_16:0_18:2	-1,25	-0,52	0,31	0,75	-0,14	0,36
TG 16:0_16:1_18:1	-1,02	0,75	0,95	1,45	-0,61	-0,86
TG 16:0_17:1_18:1	-0,88	-0,79	0,67	2,16	-0,42	-0,45
TG 16:0_18:1_18:1	-0,29	0,13	0,35	1,15	-0,01	-0,75
TG 53:2	-0,66	-0,81	0,69	2,33	-0,40	-0,66
TG 16:0_18:1_20:1	-0,18	-0,11	0,47	1,67	0,04	-1,05
TG 18:0_18:1_19:1	-0,66	-0,78	0,65	2,16	-0,42	-0,54
TG 16:0_16:0_18:3	-0,95	-0,64	0,12	0,79	0,04	0,27
TG 16:0_16:1_18:2	-1,54	-0,78	0,12	0,94	-0,42	0,81
TG 16:1_16:1_18:1	-1,55	0,81	0,77	1,69	-1,04	-0,42
TG 51:3	-1,13	-1,22	-0,02	1,68	-0,44	0,56
TG 16:0_18:1_18:2	-0,92	-1,23	-0,26	0,91	0,06	0,70
TG 16:1_18:1_18:1	-1,10	0,69	0,47	1,87	-0,77	-0,67
TG 17:1_18:1_18:1	-1,03	-0,84	0,37	2,18	-0,59	-0,09
TG 18:1_18:1_18:1	-0,54	0,51	0,25	1,64	-0,42	-0,79
TG 18:1_18:1_20:1	-0,68	0,94	0,62	1,66	-0,99	-0,82
TG 18:1_18:1_22:1	-0,72	0,72	0,86	1,51	-1,07	-0,68
TG 16:0_18:2_18:2	-1,15	-1,69	-0,74	0,35	0,01	1,66
TG 16:1_18:1_18:2	-1,45	-0,80	-0,41	1,19	-0,61	1,05
TG 18:1_18:1_18:2	-0,92	-1,18	-0,63	0,85	-0,11	1,01
TG 16:0_18:2_18:3	-0,83	-1,49	-0,95	-0,55	0,21	1,88
TG 52:5	-1,18	-1,45	-0,90	0,33	-0,36	1,88
TG 18:1_18:2_18:2	-0,98	-1,56	-1,14	0,04	0,00	1,90
TG 54:6	-0,83	-1,50	-1,04	-0,33	-0,07	1,99
TG 16:1_18:2_20:4	-0,90	-1,31	-1,18	-0,69	-0,31	2,34
TG 16:0_18:2_22:6	-0,69	-1,32	-1,22	-0,80	0,09	2,09

Z tabulky 11 lze vyčíst, že nejvyšší množství množství nasycených vazeb mastných kyselin esterů cholesterolu bylo u myši na dietě 5, nejnižší množství bylo na dietě n. Nejvyšší zastoupení mononenasycených vazeb mastných kyselin bylo na dietách 2, 3 a 4, nejnižší množství bylo na dietě n a poté následovala dieta 1. Nejvyšší zastoupení polynenasycených vazeb mastných kyselin bylo na dietách 3, 4 a 5 a nejmenší zastoupení bylo na opět na dietách 1 a n. Celkově nejvyšší zastoupení esterů cholesterolu bylo na dietách 3 a 4 a celkově nejnižší na dietách 1 a n.

Tabulka 11: Nasycenost a délka vazeb mastných kyselin u esterů cholesterolu.

	Dieta					
	1	2	3	4	5	n
CE 16:0	-0,25	0,35	0,35	0,40	0,58	-0,86
CE 16:1	-0,64	1,72	0,77	1,03	-0,92	-1,05
CE 17:1	-0,34	0,28	0,91	1,85	-0,51	-1,18
CE 18:1	-0,15	0,88	0,68	1,11	-0,26	-1,22
CE 18:2	-0,13	-0,77	0,29	0,32	0,68	-0,28
CE 18:3	-0,64	0,10	0,71	0,46	0,46	-0,70
CE 20:3	-0,38	1,67	0,66	0,79	-0,31	-1,32
CE 20:4	-0,17	0,04	0,15	-0,02	0,90	-0,59
CE 20:5	-0,57	-0,58	-0,10	0,02	1,12	-0,10
CE 22:6	-0,24	0,15	-0,63	0,30	1,02	-0,44

5.4 Analýza diet

V této kapitole jsou zahrnuty a popsány výsledky měření diet pomocí hmotnostního spektrometru. Pro lepší přehlednost byly použity kombinace tabulek a heatmap. Transformovaná (log2) a škálovaná data v tabulkách ukazují, jak se hodnoty liší od průměrné hodnoty dané sloučeniny. Červená barva značí vyšší lipidové zastoupení a modrá barva značí nižší lipidové zastoupení. Jsou seřazeny primárně dle počtu dvojných vazeb a sekundárně dle délky uhlíkatých řetězců.

V tabulce 12 lze vidět, že nejvyšší zastoupení nasycených vazeb mastných kyselin triglyceridů je u diety 3 a nejnižší zastoupení je u diety 2 a n. Tyto výsledky jsou plně v souladu s údaji, které jsou oficiálně uváděny ve složení diet (viz Metodika).

Tabulka 12: Nasycené vazby mastných kyselin triglyceridů v dietách.

	Dieta					
	1	2	3	4	5	n
TG 12:0_12:0_12:0	-0,94	-1,64	2,38	-1,03	-1,08	-2,47
TG 12:0_12:0_14:0	-1,07	-1,74	2,39	-0,99	-1,16	-2,2
TG 40:0	-0,96	-1,79	2,3	-0,95	-0,94	-2,26
TG 12:0_15:0_16:0	-0,67	-1,32	1,44	-0,15	-0,68	-1,5
TG 12:0_14:0_18:0	-0,24	-1,83	1,87	-0,08	-0,26	-3,21
TG 14:0_16:0_16:0	-0,28	-1,62	1,37	0,71	-0,38	-2,54
TG 47:0	-0,53	-1,17	1,2	1,36	-0,99	-2,26
TG 14:0_16:0_18:0	1,4	0,41	-0,32	-0,58	0,7	-0,98
TG 15:0_16:0_18:0	-0,41	-1,39	0,96	1,58	-0,78	-1,87

V tabulce 13 lze vidět, že nejvyšší zastoupení mononenasycených vazeb mastných kyselin triglyceridů je u diety 3 a 4 a nejnižší zastoupení je u diet 2 a n. Tyto výsledky již nejsou zcela v souladu s oficiálními údaji. Dle oficiálního složení od výrobce by totiž měla mít nejvyšší zastoupení dieta 5 (14,52 %). Zatímco diety 3 a 4 by měly mít 9,18 a 9,19 %.

Tabulka 13: Mononenasycené vazby mastných kyselin triglyceridů v dietách.

	Dieta					
	1	2	3	4	5	n
TG 12:0_16:0_18:1	0,19	-1,87	1,12	0,66	0,73	-3,07
TG 47:1	-0,63	-1,75	1,23	1,19	-0,52	-1,99
TG 14:0_16:0_18:1	0,35	-1,58	1	0,98	0,62	-3,37
TG 15:0_16:0_18:1	-0,36	-1,97	1,19	1,51	-0,27	-2,47
TG 16:0_16:0_18:1	1,3	-0,45	-0,09	1,33	0,15	-2,06
TG 16:0_17:0_18:1	0,39	-1,39	1,04	1,39	0,08	-3,59
TG 17:0_18:0_18:1	0,1	-1,67	1,1	1,56	-0,33	-2,97
TG 18:0_18:0_18:1	0,48	-1,41	0,85	1,06	0,3	-2,98
TG 16:0_18:1_22:0	0,27	-1,47	0,62	0,88	-0,13	-1,42
TG 16:0_20:1_22:0	-0,51	-1,44	1,13	-0,08	-0,51	-0,86

V tabulce 14 lze vidět, že nejvyšší zastoupení polynenasycených vazeb mastných kyselin triglyceridů je u diety 5, následuje dieta 1, naopak nejnižší zastoupení je u diet 2 a n. Tyto výsledky jsou plně v souladu s údaji, které jsou oficiálně uváděny ve složení diet (viz Metodika).

Tabulka 14: Polynenasycené vazby mastných kyselin triglyceridů v dietách.

	Dieta					
	1	2	3	4	5	n
TG 48:2	0,44	-1,83	0,86	0,78	1,13	-3,09
TG 49:2	-0,32	-1,61	1,06	-0,25	0,37	-1,37
TG 50:2	0,52	-1,73	0,65	0,18	0,93	-1,85
TG 16:0_17:1_18:1	0,44	-1,81	0,77	1,14	0,71	-2,77
TG 16:0_18:1_18:1	0,7	-0,81	0,35	0,15	1,07	-2,16
TG 17:0_18:1_18:1	0,36	-1,83	0,82	1,27	0,74	-3,01
TG 18:0_18:1_18:1	0,39	-1,34	0,55	0,59	1,05	-2,33
TG 18:1_18:1_22:0	0	-1	0,23	0,1	0,54	-0,32
TG 48:3	0,48	-1,61	0,53	0,42	1,69	-2,58
TG 14:0_18:1_18:2	0,99	-1,51	0,32	0,29	1,89	-2,64
TG 51:3	0,57	-1,78	0,31	0,69	1,47	-1,88
TG 16:0_17:1_18:2	0,11	-1,53	1,02	0,16	0,31	-2,1
TG 16:0_18:1_18:2	0,74	-1,28	0,18	-0,23	1,4	-1,17
TG 53:3	0,77	-1,6	0,3	0,81	1,43	-2,31
TG 54:3	0,54	-1	-0,1	0,06	1,54	-0,84
TG 14:0_18:1_18:3	0,87	-1,17	0,31	-1,92	2,25	-0,97
TG 51:4	0,37	-1,41	-0,32	0,33	1,97	-0,28
TG 16:0_18:2_18:2	0,47	-0,87	-0,52	-0,15	1,85	0,26
TG 18:1_18:1_18:2	0,51	-0,46	-0,7	0,02	1,77	0,26
TG 16:0_18:2_18:3	0,47	-0,21	-1,3	0,42	2,18	1,05
TG 16:1_18:2_18:2	0,91	-0,84	-0,79	-0,26	2,68	-0,11
TG 18:1_18:2_18:2	0,45	0,12	-1,23	0,54	1,74	0,84
TG 54:6	0,66	0,66	-1,9	1,11	1,87	1,4

6 Diskuze

Nejvyšší množství nenasycených mastných kyselin v poměru k nasyceným měly diety, u kterých byl zdroj tuků sójový olej a/nebo vepřové sádlo (diety 1, 2, 5 a n). A nejnižší množství nenasycených mastných kyselin v poměru k nasyceným měly diety, u kterých byl zdroj tuků kokosový olej, hovězí lůj, máslo a palmový olej. To je v souladu s nasyceností tuků v těchto zmíněných zdrojích tuků (viz tabulka 3).

Z výsledků chovných parametrů se dle očekávání potvrdilo, že nejvyšší týdenní přírůstky byly u vysokotučných diet 3 a 5. Dieta 3 také měla nejnižší konverzi krmiva. Jak je zmíněné i ve výsledcích, dietu 5 nebylo možné vážit kvůli své drolivosti a následnému promíchání s podestýlkou (konverze a průměrná spotřeba krmiva tedy nemohla být spočítána). Nejnižší průměrné přírůstky byly opět dle očekávání u nízkotučných diet 2 a n. Dieta n měla zároveň nejvyšší konverzi krmiva, to je způsobeno složením diety ale také nejvyšší týdenní spotřebou krmiva. Překvapivě měla dieta 2 nižší konverzi krmiva než dieta 1, která byla řazena mezi tučné diety. To mohlo být způsobeno dobrou kombinací ve složení mastných kyselin nebo vysokou hodnotou variačního koeficientu. Poměrně vysoké hodnoty variačních koeficientů ve výsledcích z chovných parametrů mohlo způsobit poměrně nízké zastoupení samců na jednotlivých dietách. Vliv také mohla mít agresivní sociální dominance, která je u samců běžná, jak píše Varholick a kol. (2018), dominance může přispívat k falešným experimentálním výsledkům. Podle nejvyšší spotřeby krmiva se dalo předpokládat, že dieta n byla nejchutnější. Nejméně chutná byla dieta 4 s hovězím lojem.

Z výsledků biochemických analýz lze vidět, že průměrné hladiny LDL, HDL a celkového cholesterolu jsou nejnižší u diet 1, 2 a n, zatímco nejvyšší u diet 3, 4 a 5. Pravděpodobně to souvisí i s celkovým množstvím tuků v dietě ale hlavně s poměrem mezi nasycenými a mononenasycenými či polynenasycenými mastnými kyselinami v dietě. Stručně řečeno, čím jsou nižší průměrné hladiny LDL, HDL a celkového cholesterolu, tím vyšší jsou hodnoty mononenasycených či polynenasycených mastných kyselin v dietě. Tím se potvrdilo, co píšou autoři citovaní v literární rešerši (Matouš a kol. 2016 a Pokorný 2006). Matouš a kol. (2010) píše, že nenasycené mastné kyseliny snižují hladinu celkového a LDL cholesterolu v krevní plazmě. Pokorný (2006) udává, že nasycené mastné kyseliny zrychlují tvorbu cholesterolu, který je vázán v LDL. Lze tedy předpokládat, že samci, kteří byli na dietách 3, 4 a 5 trpěli aterosklerózou a tím mohly následovat kardiovaskulární onemocnění. Jak píše Lančaričová (2019), zvýšená hladina LDL způsobuje aterosklerózu a zvýšený cholesterol způsobuje kardiovaskulární onemocnění. Samci na dietách 3 a 4 měli také nejvyšší množství triglyceridů v krevní plazmě, což pravděpodobně souviselo s tím, že tyto diety obsahují zdroje tuků, které mají vysoký obsah nasycených mastných kyselin. Lze očekávat, že tito samci trpěli obezitou a měli predispozice k inzulínové rezistenci. To potvrzuje Leamy a kol. (2013), který říká, že obezita a inzulínová rezistence jsou spojeny zejména se zvýšenými plazmatickými hladinami volných nasycených mastných kyselin a triglyceridů.

Z výsledků z hmotnostní spektrometrie je patrné, že samci na dietě 3 měli jednoznačně nejvíce nasycených triglyceridů, na kterém byla minimálně jednou vázána kyselina laurová. To odpovídá jejímu složení, pouze u této diety je popsán jako zdroj tuku kokosový olej, který obsahuje tuto kyselinu ve velkém množství.

Samci na dietě 4 měli nejvyšší množství nasycených triglyceridů, na kterém byla minimálně jednou vázána kyselina palmitová, která je obsažená ve velkém množství v hovězím loji. Druhé nejvyšší zastoupení těchto nasycených glyceridů měli samci na dietě 3, ve které se také nachází hovězí lůj.

Nejnižší zastoupení nasycených triglyceridů měli samci na dietě 2. To odpovídalo zdroji tuků, kterým byl sójový olej. Sójový olej je specifický právě vysokým zastoupením nenasycených mastných kyselin.

U skupiny triglyceridů s minimálně jednou vázanou mononenasycenou mastnou kyselinou je zajímavé to, že samci na dietě 1 patřili k těm, kteří jich obsahovali nejméně. Přitom dieta 1 obsahuje vepřové sádlo, které tyto mastné kyseliny obsahuje ve velkém množství. Důvod může být, že samci asi měli minimum přebytečných tuků, protože měli nejmenší průměrné týdenní přírůstky a druhou nejvyšší konverzi krmiva.

Jednoznačně nejvyšší zastoupení triglyceridů s minimálně jednou vázanou kyselinou olejovou bylo v krevní plazmě samců na dietách 3 a 4. Což zase souvisí se značným výskytem kyseliny v hovězím loji. U triglyceridů s vázanými polynenasycenými mastnými kyselinami je zřejmé, že samci na dietě n měli mnohonásobně vyšší hladiny těchto nenasycených glyceridů oproti ostatním samcům. Důvod je zřejmě způsoben jednoznačně nejvyšším zastoupením polynenasycených mastných kyselin v poměru k nasyceným oproti ostatním dietám.

Nejvyšší zastoupení v plazmě cholesterol esterů s vázanými polynenasycenými mastnými kyselinami je jednoznačně u diety 5. To je pravděpodobně způsobeno tím, že tato dieta měla nejvyšší celkové množství těchto mastných kyselin. Celkově nejnižší zastoupení cholesterol esterů bylo u diet 1 a n, což souvisí s tím, že organismus neobsahuje nebo obsahuje v malém množství přebytečné tuky. To dosvědčují nejnižší týdenní přírůstky a nejvyšší konverze krmiva samců na těchto dietách.

Jak již bylo řečeno (viz Výsledky), tak analýza složení tuků v dietách byla ve většině případů plně v souladu s údaji, které byly oficiálně udávány. Byla zde však jedna výjimka. Dle výsledků z hmotnostní spektrometrie měly nejvyšší zastoupení mononenasycených vazeb mastných kyselin triglyceridů je diety 3 a 4, ale oficiálně měla mít nejvyšší zastoupení dieta 5. To je způsobené buď výrobním nedopatřením nebo chybou v měření. Měření však byly vždy minimálně 2 vzorky, které vyšly téměř identicky. Pravděpodobnější je tedy výrobní nedopatření.

7 Závěr

Onemocnění spojená s obezitou jsou dnes v západním světě velmi aktuální tématikou. Jedním z hlavních faktorů vzniku obezity je nadměrný příjem tuků ve stravě. Velmi důležitou roli hraje také složení tuků.

Cíle práce i hypotézy se podařilo potvrdit. Bylo zjištěno, potrava má obrovský vliv na složení lipidového profilu. Přesněji řečeno, mastné kyseliny, které byly v dietách, velmi přesně kopírovali lipidový profil v krevní plazmě samců. Chovné parametry byly také velmi ovlivněny. Vysokotučné diety způsobovaly jednoznačně nejvyšší týdenní přírůstky. Dále samci na vysokotučných dietách a na dietě 4 (s hovězím lojem) vykazovaly celkově nejvyšší tělesnou hmotnost, a hlavně celkově nejvyšší zastoupení lipidů v krevní plazmě. Je tedy velmi pravděpodobné, že samci byli obézní a měli predispozice ke kardiovaskulárním onemocněním a dalším nemocem, které jsou způsobeny zvýšeným ukládáním tuků.

Z biochemických analýz bylo zjištěno, že u diet s nejvyšším zastoupením nasycených mastných kyselin analýza prokázala nejvyšší koncentraci triglyceridů v krevní plazmě. Diety s nejvyšším obsahem nenasycených mastných kyselin v poměru k nasyceným mastným kyselinám vykazovaly nejnižší týdenní přírůstky a zároveň nejvyšší konverzi krmiva. Biochemické analýzy ukázaly, že krevní plazma samců na těchto dietách obsahovala nejnižší hladiny LDL, HDL, triglyceridů a celkového cholesterolu. Hypotézy byly potvrzeny a cíle této práce splněny.

Myši jsou zvířata se sociální dominancí, která může u samců vést až k agresi. Agrese je spojena s fyzickým poraněním, které může vést až k úhynu. Sociální dominance tedy může vést ke značným výchytkám ve výsledcích, což bylo v této diplomové práci také potvrzeno. I přes toto riziko je zřejmé, že myši jsou pro svou genetickou podobnost s lidmi a také pro další chovné výhody (například malý generační interval či vysoká plodnost) velmi dobrým modelem pro nalezení léčby u lidí.

Výsledky přináší potvrzení předpokládaného metabolismu lipidů, takže je možné dle tohoto modelu upravovat lidskou stravu tak, aby bylo sníženo riziko metabolických onemocnění. Nelze ovšem opomenout, že pouze úprava stravy nestačí k zamezení metabolických poruch, velmi důležitou roli hraje také fyzická aktivita každého jedince.

V této diplomové práci byli zkoumáni pouze samci. Rozšíření toho tohoto výzkumu i na samice by bylo jistě přínosné. Pro snížení poměrně vysokých hodnot variačních koeficientů by bylo efektivnější provádět výzkum na vyšším počtu myší.

8 Literatura

- Abolins S, King EC, Lazarou L, Weldon L, Hughes L, Drescher P, Raynes JG, Hafalla JCR, Viney ME, Riley EM. 2017. The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus*. *Nature communications* **8**:14811. Available from <https://doi.org/10.1038/ncomms14811>.
- Bailoo, J.D., Murphy, E., Varholick, J.A. et al. 2018. Evaluation of the effects of space allowance on measures of animal welfare in laboratory mice. *Scientific Reports* **8**:713. Available from <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18493-6>.
- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM. 2019. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* (e56-e528). Available from <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>.
- Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, Thompson EA, Fraser KA, Rosato PC. 2016. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* **532**(7600):512–516. Available from doi:10.1038/nature17655.
- Bhattacharjee J, Kirby M, Softic S, Miles L, Salazar-Gonzalez RM, Shivakumar P, Kohli R. 2017. Hepatic natural killer T-cell and CD8+ T-cell signatures in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Communications* **1**(4):299–310. Available from doi:10.1002/hep4.1041.
- Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. 2012. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Current Protocols in Mouse Biology* **2**(2):145–165. Available from doi:10.1002/9780470942390.mo110217.
- Busquets O, Ettcheto M, Pallàs M, Beas-Zarate C, Verdaguer E, Auladell C, Folch J, Camins A. 2017. Long-term exposition to a high fat diet favors the appearance of β -amyloid depositions in the brain of C57BL/6J mice. A potential model of sporadic Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* **162**:38–45. Available from doi:10.1016/j.mad.2016.11.002.
- Cao JJ, Gregoire BR, Gao H. 2009. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone* **44**(6):1097–1104. Available from doi:10.1016/j.bone.2009.02.017.
- Duan Y, Zeng L, Zheng C, Song B, Li F, Kong X, Xu K. 2018. Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Frontiers in Immunology* **9**. Available from doi:10.3389/fimmu.2018.02649.

- Elsner M, Gehrman W, Lenzen S. 2010. Peroxisome-Generated Hydrogen Peroxide as Important Mediator of Lipotoxicity in Insulin-Producing Cells. *Diabetes* **60**(1):200–208. Available from doi:10.2337/db09-1401.
- Erizon E, Karani Y. 2020. HDL DAN ATEROSCLEROSIS. *Human Care Journal* **5**(4). Available from <https://ojs.fdk.ac.id/index.php/humancare/article/view/851>.
- Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO, Keller AJB, Keller JN. 2013. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brainfunction. *Free Radical Biology and Medicine* **56**:226–233. Available from doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.577.
- Gaskill BN, Karas AZ, Garner JP, Pritchett-Corning KR. 2013. Nest Building as an Indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice. *Journal of Visualized Experiments* **82**. Available from doi:10.3791/51012.
- Gehrman W, Würdemann W, Plötz T, Jörns A, Lenzen S, Elsner M. 2015. Antagonism Between Saturated and Unsaturated Fatty Acids in ROS Mediated Lipotoxicity in Rat Insulin-Producing Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* **36**(3):852–865. Available from doi:10.1159/000430261.
- Gordon CJ. 2012. Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology* **37**(8):654–685. Available from doi:10.1016/j.jtherbio.2012.08.004.
- Guillemot-Legris O, Masquelier J, Everard A, Cani PD, Alhouayek M, Muccioli GG. 2016 High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *Journal of Neuroinflammation* **13**(1):206. Available from <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0666-8>.
- Hawkins P, Golledge HDR. 2018. The 9 to 5 Rodent – Time for Change? Scientific and animal welfare implications of circadian and light effects on laboratory mice and rats. *Journal of Neuroscience Methods* **300**:20-25. Available from <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.014>.
- Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. 2018. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**(18):3313–3327. Available from doi:10.1007/s00018-018-2860-6.
- Kappel S, Hawkins P, Mendl MT. 2017. To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. *Animals* **7**(12):88. Available from <https://doi.org/10.3390/ani7120088>.
- Kothari V, Luo Y, Tornabene T, O'Neill AM, Greene MW, Geetha T, Babu JR. 2017. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. **1863**(2). Available from 499–508. doi:10.1016/j.bbadis.2016.10.006.
- Lančaričová A. 2019. Zbraň proti cholesterolu. Quark **12**. Available from <https://www.quark.sk/zbran-proti-cholesterolu/>.
- Lang P, Hasselwander S, Li H, Xia N. 2019. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. Scientific Reports **9**(1). Available from doi:10.1038/s41598-019-55987-x.
- Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. 2013. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. Progress in Lipid Research **52**(1):165–174. Available from doi:10.1016/j.plipres.2012.10.004.
- Lin J, Judd S, Le A, Ard J, Newsome BB, Howard G, Warnock DG, McClellan W. 2010. Associations of dietary fat with albuminuria and kidney dysfunction. The American Journal of Clinical Nutrition **92**(4):897–904. Available from doi:10.3945/ajcn.2010.29479.
- Matouš B. 2010. Základy lékařské chemie a biochemie. Galén, Praha.
- Natividad JM, Lamas B, Pham HP, Michel ML, Rainteau D, Bridonneau C, Costa G, Vlieg J. 2018. Bilophila wadsworthia aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. Nature Communications **9**(1). Available from doi:10.1038/s41467-018-05249-7.
- Pereira-Silva DC, Machado-Silva RP, Castro-Pinheiro C, Fernandes-Santos C. 2019. Does gender influence cardiovascular remodeling in C57 BL /6J mice fed a high-fat, high-sucrose and high-salt diet? International Journal of Experimental Pathology **100**:153-160. Available from doi:10.1111/iep.12318.
- Perez PA, DiPatrizio NV. 2018. Impact of maternal western diet-induced obesity on offspring mortality and peripheral endocannabinoid system in mice. PLOS ONE **13**(10) (e0205021). Available from doi:10.1371/journal.pone.0205021.
- Pokorný J. 2006. Nasycené mastné kyseliny v tukách: nepůsobí všechny stejně. Výživa a potravinářství **4**. Available from <https://www.vyzivaspol.cz/nasycene-mastne-kyseliny-v-tucich-nepusobi-vsechny-stejne/>.
- Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, Massy Z, Wanner Ch, Anders HJ. 2017. Chronic kidney disease. Nature Reviews Disease Primers, **3**:17088. Available from doi:10.1038/nrdp.2017.88.

- Rosshart SP, Herz J, Vassallo BG, Hunter A, Wall MK, Badger JH, McCulloch JA, Anastasakis DG. 2019. Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science* 365:444. Available from doi:10.1126/science.aaw4361.
- Ruiz-Núñez B, Dijck-Brouwer DAJ, Muskiet FAJ. 2016. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 36:1–20. Available from doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.007.
- Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. 2015. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity. *Current Obesity Reports* 4(2):250–261. Available from doi:10.1007/s13679-015-0152-0.
- Schulz MD, Atay Ç, Heringer J, Romrig FK, Schwitalla S, Aydin B, Ziegler PK, Varga J, Reindl W. 2014. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature* 514(7523):508–512. Available from doi:10.1038/nature13398.
- Soška V. 2001. Poruchy metabolismu lipidů. Grada Publishing, Praha.
- Speakman JR. 2019. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *International Journal of Obesity* 43:1491-1492. Available from doi:10.1038/s41366-019-0363-7.
- Tallent BR, Law LM, Rowe RK, Lifschitz J. 2018. Partial cage division significantly reduces aggressive behavior in male laboratory mice. *Laboratory Animals* 52(4):384-393. Available from <https://doi.org/10.1177/0023677217753464>.
- Tian L, Wang C, Xie Y, Wan S, Zhang K, Yu X. 2017. High Fructose and High Fat Exert Different Effects on Changes in Trabecular Bone Micro-structure. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 22(3):361–370. Available from doi:10.1007/s12603-017-0933-0.
- Unruh D, Srinivasan R, Benson T, Haigh S, Coyle D, Batra N, Keil R, Sturm R, Blanco V. 2015. Red Blood Cell Dysfunction Induced by High Fat Diet: Potential Implications for Obesity-Related Atherosclerosis. *Circulation*, (CIRCULATIONAHA.115.017313). Available from doi:10.1161/circulationaha.115.017313
- Varholick JA, Bailoo JD, Palme R, Würbel H. 2018. Phenotypic variability between Social Dominance Ranks in laboratory mice. *Scientific Reports* 8(1). Available from doi:10.1038/s41598-018-24624-4.
- Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, Wang ZP. 2011. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition*, 27(2):214–220. Available from doi:10.1016/j.nut.2009.11.012.

Yao K, Duan Y, Li F, Tan B, Hou Y, Wu G, Yin Y. 2016. Leucine in Obesity: Therapeutic Prospects. *Trends in Pharmacological Sciences* **37**(8):714–727. Available from doi:10.1016/j.tips.2016.05.004.