

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

REA JAROŠOVÁ



**Vliv účinných složek rybího tuku v krmné dávce prasat na
expresi vybraných proteinů modulující zánětlivou reakci**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

Vypracovala:
Bc. Rea Jarošová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv účinných složek rybího tuku v krmné dávce prasat na expresi vybraných proteinů modulující zánětlivou reakci vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu prof. MVDr. Ing. Tomášovi Komprdovi, CSc., za poskytnuté konzultace, cenné rady a za čas strávený odborným dohledem při zpracovávání závěrečné práce. Dále bych poděkovala paní MVDr. Petře Ondráčkové, PhD., za odborné konzultace a umožnění se v rámci v projektu podílet na zpracování vzorků. Poděkování dále patří i Interní grantové agentuře AF MENDELU za poskytnuté finanční prostředky k řešení projektu č. TP5/2015.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo zjistit skutečnost, zda existuje vliv účinných složek rybího tuku, především polynenasycených mastných kyselin n-3 (PUFA n-3) na expresi vybraných proteinů modulující zánětlivou reakci u modelového organismu – prasete. U PUFA n-3 je předpoklad, že přes signální dráhu PPAR γ - NF- κ B zvyšují produkci adiponektinu, inhibují tvorbu prozánětlivých cytokinů, zvyšují tvorbu protizánětlivých cytokinů a tím potlačují zánětlivou reakci v organismu. Tato hypotéza byla testována na 32 prasatech, která byla rozdělena do dvou skupin po 16 kusech v každé skupině. První experimentální skupina byla krmena základní krmnou směsí obohacenou o 2,5 % rybího oleje (F) a druhá kontrolní skupina byla krmena základní krmnou směsí s 2,5 % palmového oleje (P). 70. den výkrmu bylo 8 F prasatům a 8 P prasatům aplikován intravenózně lipopolysacharid (LPS) pro vyvolání zánětlivé reakce, zbytek ponechán bez stimulace LPS, následovala intramuskulární aplikace anestetik a porážka. Pomocí metody Western-Blott byla změřena míra exprese proteinů PPAR γ , NF- κ B a adiponektinu ve vybraných tkáních, metodou ELISA koncentrace adiponektinu v plazmě a multiplexní analýzou plazmatické hladiny cytokinů. Výsledky ukazují, že koncentrace PPAR γ se u F adipocytů po podání LPS měla tendenci zvýšit o 21 % ve srovnání s P kontrolou ošetřenou LPS, avšak výsledek nebyl statisticky průkazný ($P > 0,05$; $P = 0,11$). Dále byla u F prasat ošetřených LPS ve srovnání s intaktními F protějšky tendence ke zvýšení plazmatické hladiny adiponektinu o 18 %, které bylo pravděpodobně odrazem tendence k vyšším hodnotám v adipocytech o 18 % ($P > 0,05$; $p = 0,12$), výsledek nebyl statisticky průkazný. Plazmatický adiponektin nabýval stejných hodnot $21,1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ u experimentální i kontrolní skupiny ($P > 0,05$). Zvýšení ($P < 0,05$) NF- κ B v tukové tkáni F prasat po stimulaci LPS. Dále byla u skupiny F prasat stimulovaných LPS zvýšená ($P < 0,05$) plazmatická hladina protizánětlivých interleukinů IL-4 a IL-10, ale i prozánětlivého cytokinu TNF- α . Výsledky v předkládaném experimentu jsou tedy nejednoznačné. Hypotézu, potvrzující vliv rybího oleje, respektive PUFA n-3, na potlačení zánětlivé reakce nelze tímto experimentem průkazně potvrdit.

Klíčová slova: PUFA n-3, adiponektin, PPAR γ , NF- κ B, Western- Blott

ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether there is an influence of the active components of the fish oil, in particular polyunsaturated fatty acids n-3 (PUFA n-3) on expression of selected proteins which modulate the inflammatory response in model organisms - pig. In the n-3 PUFA is to assume that over signaling pathway PPAR γ - NF- κ B, increase adiponectin production, inhibit the production of pro-inflammatory cytokines, increase anti-inflammatory cytokines production, thereby suppressing the inflammatory response in the body. This hypothesis was tested on 32 pigs, which were divided into two groups of 16 pieces in each group. The first experimental group was fed the basic feed mixture enriched with 2.5% fish oil (F) and the second control group was fed the basic feed with 2.5% palm oil (P). Last day of fattening pigs were 8 F and 8 P pigs intravenously application lipopolysaccharide (LPS) to induce an inflammatory response, the rest of group left without LPS stimulation, followed by intramuscular application of anesthetics and defeat. By Western blot was measured protein expression PPAR γ and NF- κ B in selected tissues, by ELISA concentration of adiponectin in plasma and by multiplex analysis plasma levels of cytokines. The results indicate that PPAR γ concentration in the F adipocytes after LPS stimulation tended to increase by 21% in comparison with P control stimulation with LPS, but the result was not statistically significant ($P > 0.05$; $P = 0.11$). Further, the F pigs stimulation with LPS as compared with intact F counterparts trend toward increased plasma levels of adiponectin by 18%, which was likely a reflection of the tendency to higher values in adipocytes by 18% ($P > 0.05$, $p = 0.12$), result was not statistically significant. Plasma adiponectin took on the same values of $21.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ in experimental and control groups ($P > 0.05$). Elevation ($P < 0.05$) of NF- κ B in fatty tissue F pigs after LPS stimulation. In addition, the plasma level of anti-inflammatory IL-4 and IL-10 interleukins, as well as the proinflammatory cytokine TNF- α , was increased ($P < 0.05$) in the F group of pigs stimulated with LPS. The results of the present experiment are thus ambiguous. The hypothesis of the effect of fish oil or n-3 PUFA to suppress the inflammatory response cannot this experiment conclusively confirmed.

Keywords: n-3 PUFA, adiponectin, PPAR γ , NF- κ B, Western- Blott

OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 Lipidy a jejich klasifikace	11
3.2 Mastné kyseliny a jejich klasifikace	11
3.2.1 Charakteristika nasycených mastných kyselin	12
3.2.2 Charakteristika nenasycených mastných kyselin	13
3.2.3 Eikosanoidy	16
3.3 Vliv PUFA n-3 a n-6 na organismus.....	19
3.4 Zánětlivá reakce organismu	22
3.5 Genová exprese, transkripční faktory, jaderné receptory.....	23
3.5.1 Nukleární receptory PPAR	25
3.5.2 Jaderný faktor kappa B	29
3.5.3 Sterol regulační element vázající protein (SREBP)	33
3.5.4 Receptor spřažený s G-proteinem (GPR120).....	34
3.5.5 Hormon Adiponektin.....	34
3.6.6 <i>ACTB</i> gen kódující β -aktin	36
3.6 Analýza proteinů imunochemickými metodami	36
3.6.1 Western-Blott	36
3.6.2 ELISA.....	39
3.6.3 Multiplexová analýza na mikrokuličkách – technologie Luminex xMAP41	
4 MATERIÁL A METODIKA.....	43
4.1 Experimentální část.....	43
4.1.1 Charakteristika krmného pokusu – modelová zvířata, podmínky chovu, krmná směs	43
4.1.2 Chemiluminiscenční test	45
4.1.3 Ošetření lipopolysacharidem (LPS)	46

4.1.4 Odběr vzorků tkání jater, tuku a krve	46
4.1.5 Detekce NF- κ B, PPAR γ	46
4.1.6 Stanovení plazmatických cytokinů a adiponektinu v plazmě.....	49
4.1.7 Analýza mastných kyselin	49
4.1.8 Statistické hodnocení	49
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	50
5.1 Průměrná spotřeba krmiva	50
5.2 Průměrný denní přírůstek, živá hmotnost prasat.....	50
5.3 Test stimulované chemiluminiscence	51
5.4 Adiponektin, PPAR γ	52
5.5 Stanovení hladiny NF- κ B.....	56
5.6 Plazmatická koncentrace cytokinů	58
6 ZÁVĚR	61
LITERÁRNÍ ZDROJE	63
INTERNETOVÉ ZDROJE.....	74
SEZNAM OBRÁZKŮ	75
SEZNAM TABULEK	76
SEZNAM ZKRATEK	77

1 ÚVOD

Omega 3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA n-3), patří do skupiny látek nazývaných nutraceutika, neboli funkční potraviny, jejichž příjem má pozitivní vliv na zdraví lidského organismu. PUFA mají esenciální charakter, to znamená, že si je savčí organismy neumí sami syntetizovat a je důležitý jejich příjem v potravě. Nejvýznamnějšími esenciálními nenasycenými mastnými kyselinami ve výživě člověka, respektive savců jsou kyseliny linolová (n-6), ze kterých se následnými chemickými reakcemi tvoří kyselina arachidonová (AA), a α -linolenová (n-3), která je prekurzorem pro kyseliny eikosapentanovou (EPA) a kyselinu dokosahexanovou (DHA). Charakteristickým znakem těchto kyselin je přítomnost několika dvojných vazeb v jejich strukturách.

Důležitým faktorem v příjmu PUFA je jejich vzájemně vyvážený poměr. Optimální poměr nenasycených mastných kyselin z řad n-6/n-3 ve stravě, by měl být maximálně 4/1. Reálné hodnoty poměru n-6/n-3 se však pohybují kolem 15-20/1. Metabolity, které vznikají z PUFA, ovlivňují v organismu mnoho tělesných funkcí, účinky se podobají hormonům a při svém vzniku si přirozeně konkurují. Kyseliny z řady n-6 fungují jako prekurzory pro látky, které v nadbytku působí na organismus negativním vlivem. Podporují rozvoj především civilizačních chorob, jako jsou obezita, inzulinová rezistence nebo hyperglykémie. Vyšší zastoupení kyselin n-6 je tedy nežádoucí. Oproti tomu metabolity vzniklé z kyseliny řady n-3, zejména pak z EPA a z DHA, vykazují široké spektrum pozitivních účinků na zdraví organismu člověka (Klusáčková a Skoumalová, 2012).

Tato diplomová práce je zaměřena na studium vlivu EPA a DHA na mechanismus, který je schopen regulace, omezení či potlačení zánětu v organismu. Přes signální dráhu PPAR γ - NF- κ B v cílových buňkách, ovlivňují transkripci genů spojených s imunitními pochody. EPA a DHA jsou endogenními ligandy jaderných receptorů aktivovaných proliferátory peroxizomů (PPAR), které po svém navázání zvyšují syntézu PPAR. Ty svým působením ovlivňují produkci adiponektinu, hormonu tukové tkáně, který působí v organismu protizánětlivě. Na druhé straně jaderný faktor kappa B (NF- κ B), iniciuje v cílových buňkách produkci prozánětlivých cytokinů a tím indukuje zánětlivou reakci. Zvýšením syntézy PPAR dochází k inhibici transkripčního faktoru NF- κ B. U prasat, podobně jako u člověka, funguje stejná aktivační dráha PPAR a tyto druhy označujeme

jako neproliferující. Především experimenty zaměřené na výzkum pozitivních účinků EPA a DHA na potlačení zánětu a snížení rizika kardiovaskulárních chorob, byly prováděné na laboratorních potkanech, u kterých funguje odlišná aktivační dráha PPAR a řadíme je k druhům proliferujícím.

Očekávané výsledky pokusu prováděného na experimentálních prasatech, by měly přinést mnohem přesnější informace, než předchozí pokusy prováděné na hlodavcích. Získaná data by mohla přesněji odrážet mechanismy, které podobně fungují i u člověka a potenciální nové terapeutické postupy by bylo možné snáze aplikovat v humánní medicíně.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

1. Studium dostupné literatury zaměřené na téma vliv kyselin eikosapentanové (EPA) a dokosahexanové (DHA) na buněčné signální dráhy, které souvisí s modulací zánětlivé reakce
2. Podrobněji je tato práce zaměřena na buněčné receptory a transkripční faktory, především na jaderný faktor kappa B (NF-kappa B)
3. Zúčastnění se spolupráce při odběru vzorků vybraných tkání prasat a příprava k jejich analýze
4. Kvantifikace míry exprese vybraných proteinů pomocí metody Western-Blott v testovaných prasečích tkáních
5. Získané výsledky vyhodnoceny pomocí vhodných statistických metod a zpracovány formou diplomové práce

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Lipidy a jejich klasifikace

Lipidy neboli tuky (z řeckého slova *lipos* neboli tučný) patří mezi organické sloučeniny, které se vyznačují nerozpustností ve vodě a dobrou rozpustností v nepolárních organických rozpouštědlech jako jsou ether, chloroform, benzen. Lipidy lze rozdělit na jednoduché a složené. Jednoduché lipidy jsou estery vyšších karboxylových (mastných) kyselin a vyšších alkoholů. Jednoduché lipidy tvoří triacylglyceroly (tuky), vosky a acylsteroly. Složené lipidy obsahují ve svých strukturách navíc polární složku, která jim dodává amfifilní charakter, což znamená, že část molekuly lipidu má hydrofilní a druhá část hydrofobní charakter. Složené lipidy lze rozdělit na fosfolipidy a glykolipidy, které plní v organismu významné role, slouží především jako rezervoáry a zdroje energie a jsou významnou součástí biologických membrán (Murray *et al.*, 2001).

Třetí poněkud odlišnou skupinou lipidů jsou izoprenoidní lipidy, ke kterým řadíme látky nazývané steroly. Nejvýznamnějším zástupcem sterolů je cholesterol a žlučové kyseliny například kyselina cholová a kyselina acetylcholová (Holeček, 2006).

3.2 Mastné kyseliny a jejich klasifikace

Mastné kyseliny (MK) se ve volné přírodě vyskytují ve dvou formách. Jako volné neboli neesterifikované MK, které se nacházejí volně rozptýlené v krevní plazmě, ve vodném prostředí snadno disociují a ve své struktuře mají maximálně 10 uhlíků. A vázané MK, neboli esterifikované, které jsou součástí jiných lipidů, například acylglycerolů nebo fosfolipidů, ke kterým se estericky váží.

Většina MK má ve svých strukturách sudý počet uhlíků a tvoří lineární řetězce. Molekuly MK mají na jednom konci svého řetězce navázanou karboxylovou skupinu (COOH) a na druhém konci jsou tvořeny methylovou skupinou (CH₃), (Holeček, 2006).

Podle (Murray *et al.*, 2001) lze mastné kyseliny dělit do několika skupin podle délky uhlíkového řetězce, jeho struktury nebo stupně nasycení:

1. Dle délky uhlíkového řetězce:

krátký řetězec (short-chain fatty acid – SCFA) obsahující méně než 6 uhlíků

středně dlouhý řetězec (medium-chain fatty acid – MCFA) se 6-12 uhlíky

dlouhý řetězec (long-chain fatty acid – LCFA) se 14-20 uhlíky

velmi dlouhý řetězec (very long-chain fatty acid – VLCFA) s více než 20 uhlíky ve své struktuře

2. Dle struktury uhlíkového řetězce:

- lineární
- rozvětvený

3. Dle stupně nasycení:

- a) nasycené MK - neobsahují ve svých strukturách dvojnou vazbu
- b) nenasycené MK – obsahují ve svých molekulách jednu nebo více dvojných vazeb

Podle počtu dvojných vazeb lze nenasycené MK rozdělit:

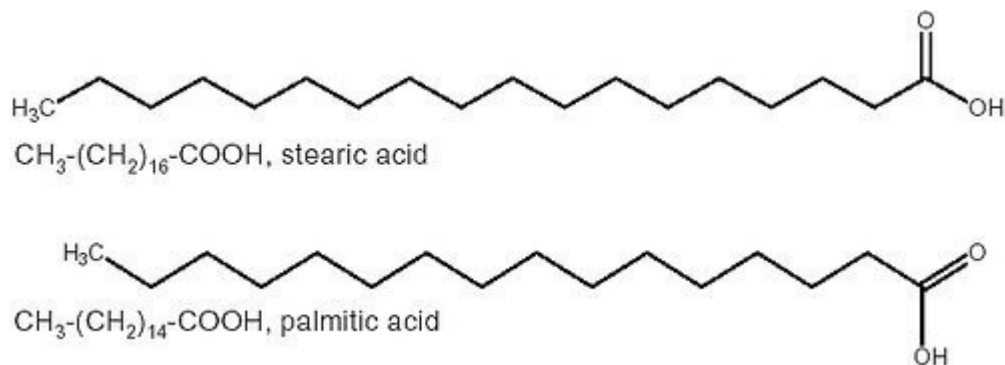
- monoenové neboli mononenasycené (MUFA) – obsahují pouze jednu dvojnou vazbu
- polyenové neboli polynenasycené (PUFA) – obsahují více dvojných vazeb

MK představují důležité komponenty biologických membrán, slouží k udržení jejich struktury a funkce. Ve formě triacylglyceridů jsou MK bohatým zdrojem pro energetický metabolismus a na základě jejich štěpení získávají buňky velké množství ATP (Klusáčková a Skoumalová, 2012).

3.2.1 Charakteristika nasycených mastných kyselin

Nasycené mastné kyseliny jsou obsaženy především v tucích živočišného původu, například hovězí lůj, vepřové sádlo, máslo. Výjimkou jsou nasycené mastné kyseliny obsažené v kokosovém nebo palmovém oleji. Tyto tuky se v savčím organismu štěpí a uvolněné mastné kyseliny slouží jako důležitý zdroj energie. Jsou také důležitou součástí biologických membrán. Nadměrný příjem těchto nasycených MK má na organismus negativní vliv, zvyšuje hladinu LDL cholesterolu v krvi, čímž podněcuje rozvoj civilizačních chorob, jako jsou obezita, choroby oběhového systému nebo ateroskleróza (Svačina *et al.*, 2008).

Zástupci nejvýznamnějších nasycených mastných kyselin: kyselina palmitová (C16), kyselina stearová (C18), (obr. 1).

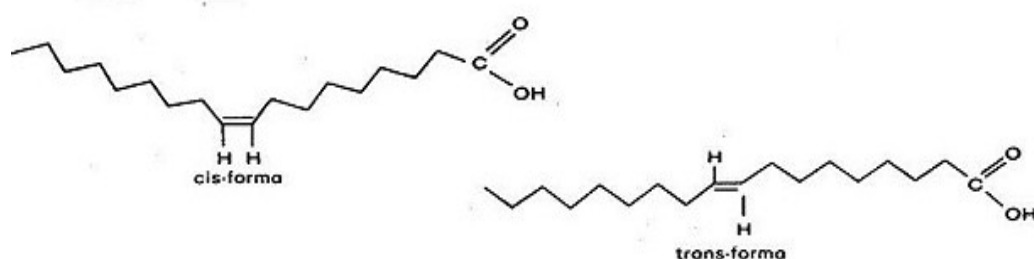


Obr. 1 Strukturní vzorec kyseliny palmitové a stearové (převzato a upraveno z: <http://bioche.webgarden.cz/rubriky/chemie-galerie/strukturni-vzorci-vyssich>)

3.2.2 Charakteristika nenasycených mastných kyselin

Nenasycené mastné kyseliny jsou zastoupeny převážně v rostlinných tucích, některé se nacházejí i v tucích živočišného původu, například v rybím tuku. V přírodě se nenasycené MK vyskytují ve dvou geometrických uspořádáních neboli stereoizomerech. Jedná se o uspořádání *cis* a *trans* (obr. 2).

Cis-konfigurace zabezpečuje, že obě části řetězce jsou umístěny na stejné straně roviny proložené dvojnou vazbou, v místě ohnutí svírají úhel 120° a ohýbají strukturu MK do tvaru L. Tato konfigurace se v přírodě vyskytuje přirozeně a má nižší bod tání, oproti tomu *trans*-konfigurace MK má obě části řetězce lokalizovány na opačných stranách roviny proložené dvojnou vazbou a řetězec je lineární (Murray *et al.*, 2001).



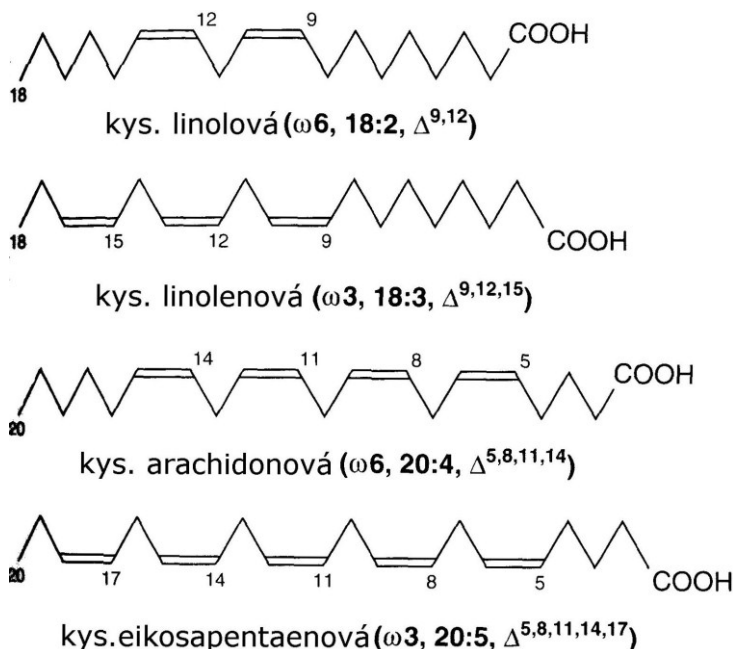
Obr. 2 *Cis* a *trans* konfigurace MK (převzato a upraveno z: <http://slideplayer.cz/slide/3185919/>)

Mononenasycené MK patří do skupiny neesenciálních látek, tudíž si je savčí organismus umí sám syntetizovat. V přírodě se tyto mononenasycené MK nacházejí v

tucích obsažených v avokádu, ořechách nebo olivovém oleji. Jsou odvozeny od kyseliny olejové a dvojná vazba je umístěna na devátém uhlíku (Simopoulos, 2005).

Podle polohy první dvojně vazby umístěné od methylové skupiny lze polyneenasycené mastné kyseliny rozdělit do několika skupin:

- Kyseliny řady Omega-3 – u kterých se první dvojná vazba vyskytuje na třetím uhlíku od konce methylové skupiny. Jejimi nejvýznamnějšími zástupci jsou kyseliny α -linolenová (ALA), eikosapentanová (EPA), dokosahexanová (DHA). Tyto Omega-3 kyseliny jsou velmi důležité pro savčí organismus, který si je neumí sám syntetizovat *de-novo* a je nezbytný jejich příjem stravou (Klusáčková a Skoumalová, 2012).
- Kyseliny řady Omega-6 – mají první dvojnou vazbu umístěnou na šestém uhlíku od methylové skupiny. Do této skupiny patří například kyseliny γ -linolenová (GLA) a arachidonová (AA), které jsou rovněž esenciální (obr. 3).
- Kyseliny řady Omega-9 – první dvojná vazba leží na devátém uhlíku od methylové skupiny, jejími zástupci jsou kyseliny olejová, elaidová nebo eruková (Murray *et al.*, 2001).



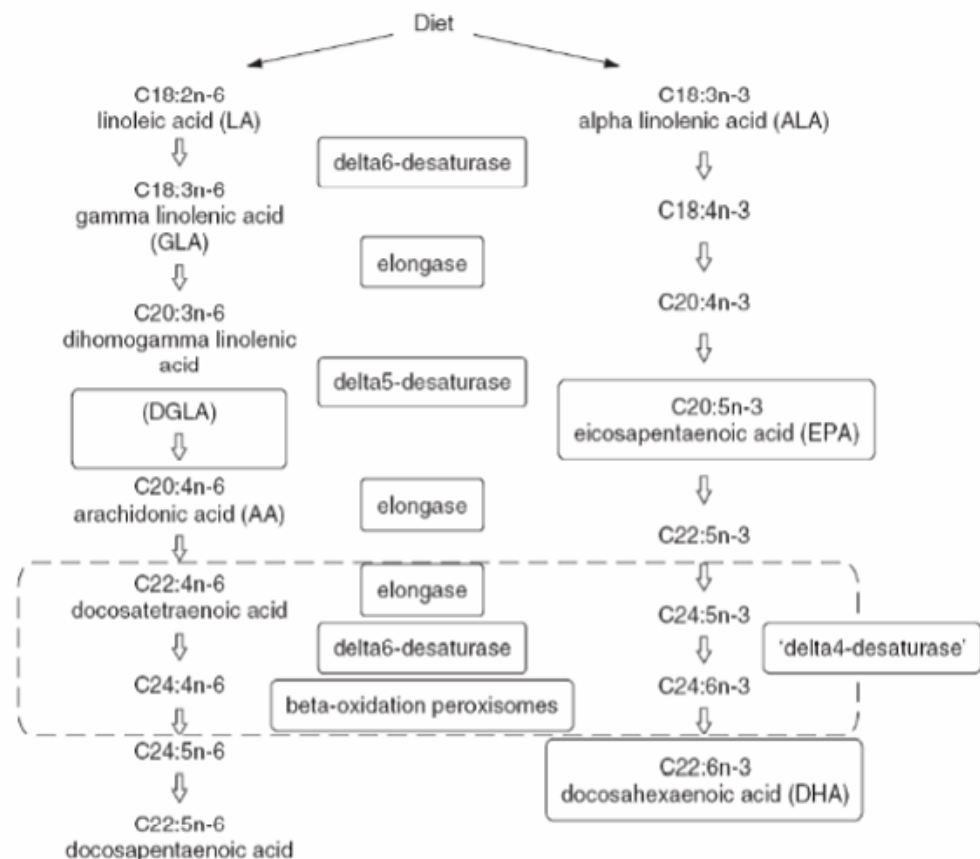
Obr. 3 Strukturální vzorce polyneenasycených mastných kyselin ω -3, ω -6 (Rovenská, 2009)

3.2.2.1 Charakteristika polynenasycených mastných kyselin n-3 (PUFA n-3)

Prekurzorem pro syntézu polynenasycených mastných kyselin řady n-3 jako jsou kyseliny eikosapentanová (EPA) a dokosahexanová (DHA) je kyselina α -linolenová (ALA), která je syntetizována pouze rostlinnými organismy a jejím zdrojem ve výživě savců jsou například lněná semínka, listová zelenina nebo řepkový olej. Kyselina α -linolenová se v savčím organismu během metabolických procesů mění procesem elongace neboli prodlužováním uhlíkového řetězce a desaturací neboli vznikem následných dvojných vazeb (obr. 4). Z původní kyseliny α -linolenové (C 18:3) vzniká kyselina eikosapentanová (C 20:5) a kyselina dokosahexanová (C 22:6), jež jsou prekurzory pro skupinu látek zvanou eikosanoidy, ke kterým řadíme prostaglandiny, tromboxany typu A3 a leukotrieny typu B5. Ty jsou velmi významné pro své funkce v savčím organismu, ve kterém působí protizánětlivě, antiarytmicky, antitromboticky a umožňují vazodilataci cév (Komprda, 2012).

3.2.2.2 Charakteristika polynenasycených mastných kyselin n-6 (PUFA n-6)

Prekurzorem pro syntézu kyselin řady n-6, které jsou reprezentovány hlavně kyselinou arachidonovou (AA), je kyselina linolová (LA). Zdrojem LA jsou vejce, obiloviny nebo slunečnicový olej, ze které elongačními a desaturačními procesy vzniká kyselina γ -linolenová (GLA), která je následně elongována na kyselinu dihomo- γ -linolenovou (DGLA), která slouží jako prekurzor pro syntézu prostaglandinů typu E2, nebo je dále přeměněna na AA, která je prekurzorem pro tromboxany A2 a leukotrieny B4. PUFA řady n-6 mají schopnost aktivovat receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR), jejichž vlivem dochází k zvýšené syntéze cholesterolu, který má při nadbytku negativní vliv na zdraví organismu (Murray *et al.*, 2001).

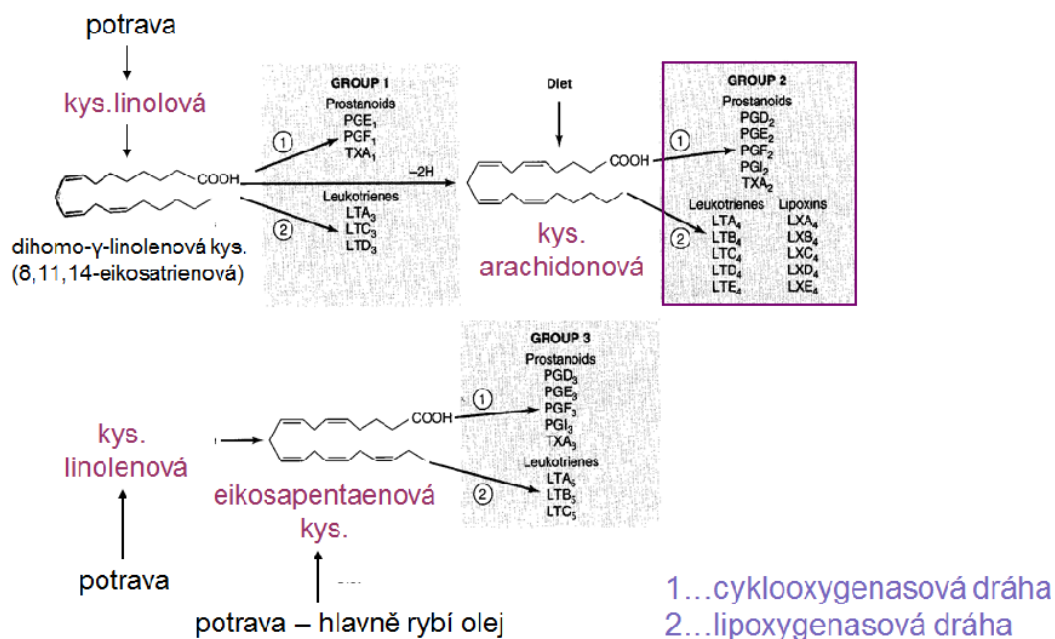


Obr. 4 *Metabolismus polyneenasycených mastných kyselin řady n-3 a n-6 (Simopoulos, 2005)*

3.2.3 Eikosanoidy

Eikosanoidy jsou vnitrobuněčné signalizační molekuly, odvozené od dvacetihlíkatých mastných kyselin. Eikosanoidy jako oxygenované produkty vznikají v metabolismu polyneenasycených MK hlavně z LA, AA a ALA, díky účinkům enzymů cyklooxygenáz (COX), lipoxygenáz (LOX), cytochromu P450 i neenzymaticky v ostatních metabolických cestách (obr. 5).

K eikosanoidům řadíme prostaglandiny a tromboxany společně označované jako prostanoidy, dále leukotrieny, lipoxiny, hydroxyeikosatraenové kyseliny (HETE) a hepoxiliny (Rovenská, 2009).



Obr. 5 Biosyntéza eikosanoidů z LA, ALA (Rovenská, 2009)

Eikosanoidy jsou produkovány v endoteliálních buňkách, dále v leukocytech, v krevních destičkách nebo v ledvinových kanálech. Hlavním krokem vzniku eikosanoidů je aktivace fosfolipázy A2 (PLA2), která svým působením uvolňuje arachidonát z membránových fosfolipidů, tento proces však může být blokován protizánětlivými steroidy (Komprda, 2012). Následně dochází k biosyntéze z arachidonátu COX nebo LOX dráhami, spřažené s dalšími úpravami syntázami nebo isomerázami v závislosti na buněčném typu (Rovenská, 2009).

COX dráha vede ke vzniku prostacyklinů a prostanoidů (prostaglandinů a tromboxanů), LOX dráha vede k syntéze leukotrienů, lipoxinů, hepoxilinů a enzymy cytochromu P450 (monooxygenázy) vedou ke vzniku některých HETE a jsou hlavní dráhou v proximálních tubulech ledvin (Komprda, 2012). Expresi PLA2 stimulují například interleukin 1, thrombin nebo adrenalin, naopak blokaci aktivace PLA2 způsobuje například annexin 1, který je proteinem indukovaný glukokortikoidy (Rovenská, 2009).

Biologické účinky eikosanoidů se liší podle druhu eikosanoidu, receptoru i místa, ve kterém působí. Účinky se velmi podobají účinkům hormonů, působí už ve velmi malých koncentracích a mají krátký poločas rozpadu. Působí na organismus parakrinně i autokrinně. V organismu zprostředkovávají prozánětlivou odpověď, hlavně v případě kůže, očí a kloubů, účastní se vzniku horečky a bolesti, podílí se na regulaci krevního

tlaku nebo regulaci koagulace, ovlivňují činnosti ledvin a účastní se kontroly některých dějů spojených s rozmnožováním například při porodu (Komprda, 2012).

3.2.3.1 Účinky prostaglandinů v organismu

Prostaglandiny fungují v organismu jako mediátory zánětu, způsobují vazodilataci, zarudnutí, horkost (PGE₁, PGE₂, PGD₂, PGI₂), dále zvyšují permeabilitu cév a způsobují vznik otoku (PGE₂, PGD₂, PGI₂). Regulují bolest a horečku (PGE₂), stimulují svalstvo dělohy při porodu (PGE₂, PGF₂). PGE inhibují žaludeční sekreci HCl, dále snižují systémový arteriální tlak (PGE, PGA, PGI₂). PGI₂ má značný protiagregační účinek, PGE₂ inhibuje resorpci vody a Na⁺ ve sběrném kanálku ledvin. PGI₂ reguluje glomerulární filtraci (Rovenská, 2009).

3.2.3.2 Účinky tromboxanů v organismu

Tromboxany jsou syntetizovány krevními destičkami, v organismu vyvolávají vazokonstrikci (TXA₂) a agregaci destiček. Tromboxany a prostaglandiny typu PGI₂ působí v organismu v procesu regulace koagulace antagonisticky. TXA₂ je produkován v ledvinových kanálech a působí silnějším agregačním stimulem než TXA₃. TXA₃ a PG₃ inhibují uvolňování arachidonátu a následnou tvorbu TXA₂ (Komprda, 2012).

3.2.3.3 Účinky leukotrienů v organismu

Leukotrieny se syntetizují především v leukocytech, které jsou na ně vybaveny receptory. Leukotrieny (LTC₄, LTD₄, LTE₄) mají silný bronchokonstrikční účinek a označují se jako *slow-reacting substance of anaphylaxis* (SRS-A), dále regulují vazokonstrikci. Zvyšují permeabilitu cév, na monocyty a eozinofily působí aktivačně a chemotaktivně, podporují diapedézu, zvyšují expresi integrinů na povrchu leukocytů a podporují fagocytární schopnosti. Účastní se zánětlivých reakcí v organismu při alergických projevech, autoimunitních onemocněních a imunitní obrany proti infekcím (Rovenská, 2009).

Nadměrná produkce LTB₄ byla prokázána u některých chorob, jako například u Crohnovy choroby, psoriázy, revmatické artritidy nebo cystické fibrózy. Mohou být zodpovědné za nadprůměrnou bronchokonstrikci u některých forem astmatu a mohou se podílet na vzniku aterosklerózy.

3.2.3.4 Účinky lipoxinů v organismu

Lipoxiny (LXA₄, LXB₄) jsou syntetizovány leukocyty a krevními destičkami díky působení cytokinů IL-4 a TGF-β. V organismu působí protizánětlivě a brání přechodu akutního zánětu do chronické formy. Lipoxiny inhibují chemotaxi neutrofilů a eozinofilů, ukončují diapedézu neutrofilů. Snižují produkci leukocytárních cytokinů, určitých cytokinů fibroblastů nebo buněk střev, stimulují nezánnětlivou fagocytózu (apoptotické neutrofile), dále působí jako antagonisté receptorů pro leukotrieny nebo inhibují interakci leukocytů s endoteliálními buňkami (Rovenská, 2009).

3.3 Vliv PUFA n-3 a n-6 na organismus

Jak již bylo výše zmíněno, polynenasycené mastné kyseliny řady n-3 a n-6 a od nich odvozené eikosanoidy hrají v savčím organismu důležité role a ovlivňují mnoho fyziologických pochodů. Přítomnost PUFA v lipidové složce membrán buněk ovlivňuje funkci buněk jako nejzákladnějších jednotek živých soustav, u nichž působením na přenašeče, receptory i iontové kanály zasahuje do mechanismů transportu. Eikosanoidy odvozené od PUFA se účastní mnohých biologických pochodů spřažených s membránovým G-proteinem, jako jsou imunitní a zánětlivé odpovědi organismu, faktory při srážení krve nebo proces diferenciacie buněk (Das, 2006). Také nepřímo mohou PUFA modulovat buněčné funkce, působením prostřednictvím druhých posílů odvozených od fosfolipidů (Klusáčková a Skoumalová, 2012).

DHA tvoří součást struktury fosfolipidů, je jednou z nejrozšířenějších složek strukturálních lipidů v mozku, mozkové kůře, sítnici a dalších tkáních. EPA tvoří významnou složku esterů cholesterolu, fosfolipidů i triacylglycerolů (Simopoulos, 2005). Kyseliny EPA a DHA jako složky membrán buněk nervové tkáně mají vliv na zvyšování přenosu mezi neurony - neurotransmisi, na plasticitu jejich membrány, která ovlivňuje schopnost učit se, paměť a kognitivní funkce. Význam mají i při tvorbě neuronů tzv. neurogenezi. Přítomnost PUFA v neurálních membránách vede ke zvýšené fluiditě a zesílenému přenosu mezi neurony. Působení PUFA n-3 především DHA má protektivní vliv na rozvoj Alzeheimovy choroby, demence a deprese. Protektivní účinek DHA je dán stimulací exprese genu pro transthyretin, který je schopen vychytávat toxický amyloid β, jenž je odpovědný za rozvoj Alzeheimovy choroby. Dále snižuje jeho produkci a akumulaci v nervové tkáni (Klusáčková a Skoumalová, 2012).

Jako prekurzory eikosanoidů ovlivňují PUFA n-3 a n-6 zánětlivé odpovědi organismu, imunitní reakce a potlačují oxidativní stres, v jehož důsledku dochází k neurologickým poruchám (Žák *et al.*, 2005). Při nadbytku volných hydroxylových radikálů -OH jsou jako první napadeny PUFA, jelikož jejich početné dvojnásobné vazby snadno podléhají lipidové peroxidaci. Proces lipidové peroxidace má široké spektrum negativních důsledků na membrány buněk, u kterých dochází k poškození struktury i funkce. Oxidativní stres snižuje membránovou fluiditu, a tím zvyšuje propustnost pro ionty (Das, 2006). Má negativní vliv na oxidaci důležitých membránových proteinů, poškozuje iontové kanály a inaktivuje receptory na povrchu buněk. Řetězce polynenasycených MK jsou napadány volnými radikály za tvorby toxických aldehydů, jako jsou například malondialdehyd nebo akrolein. Tyto aldehydy se vážou na proteiny pomocí thiolových skupin kovalentními vazbami a mění jejich funkce. Pokles PUFA navozený volnými radikály a oxidačním stresem vede ke změně aktivity iontových kanálů, v jehož důsledku se zvyšuje koncentrace vápníku v buňkách a tím dochází k narušení homeostázy vápníku, jehož konečným důsledkem je degenerace a buněčná smrt (Klusáčková a Skoumalová, 2012).

PUFA mohou regulovat expresi genů na úrovni transkripčních faktorů, specifickými i nespecifickými vazbami s ligandy, které jsou zodpovědné za aktivaci transkripčních faktorů. Ty se vážou k *cis*-oblastem genu a tím ovlivňují transkripci daného genu (Zeman *et al.*, 2006). V kontrole genové exprese mastnými kyselinami jsou zahrnuty steroidní, thyroïdní nebo retinoidní receptorová nad-rodina. Jedná se o jaderné receptory, které fungují také jako ligandem aktivované transkripční faktory. PUFA mohou regulovat geny pomocí transkripčních faktorů například hepatocytárního jaderného faktoru - 4 α (HNF-4 α), jaderného faktoru $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), retinoidního X receptoru α (RXR α), jaterního X receptoru (LXR α , LXR β) nebo sterol regulačního vazebného proteinu 1-c (SREBP-1c), (Klusáčková a Skoumalová, 2012).

Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, důležitým faktorem v příjmu polynenasycených kyselin je jejich vzájemně vyvážený poměr n-6/n-3, který by měl odpovídat hodnotám 1-4/1, nicméně ve skutečnosti se tento poměr průměrně pohybuje okolo 10-20/1. To má za následek opačný - negativní vliv na zdraví člověka i zvířat (Komprda, 2012). Nadbytek eikosanoidů odvozených od kyselin řady n-6 způsobuje nerovnováhu v organismu, projevující se zvýšenou prozánětlivou odpovědí, vznikem alergií a krevních sraženin. Zvyšováním viskozity krve, dochází ke vzniku trombů a k zužování cév – vazokonstrikci (Schmitz a Ecker, 2008). Eikosanoidy odvozené od

PUFA n-6 jsou prekurzory látek zvaných prostaglandiny typu E2, což jsou hormonální sloučeniny, které kontrolují mnoho tělesných funkcí. Zlepšují srážlivost krve a podporují zadržování vody, nicméně při nadbytku těchto látek ve stravě, způsobují zánětlivé pochody v organismu (Das, 2006). Leukotrieny typu B4 jsou látky uvolňované např. bílými krvinkami při zánětech, infekcích nebo alergických reakcích. Mimo těchto pozitivních účinků, při nadbytku, výrazně zužují průdušky například u astmatického záchvatu (Schmitz a Ecker, 2008). Tromboxany typu A2 se tvoří v trombocytech, mají výše zmíněný vasokonstrikční účinek a stimulují agregaci krevních destiček. Metabolity, odvozené od kyseliny linolové, následně arachidonové působí na organismus již ve velmi malém množství, zvyšují syntézu cholesterolu a zvyšují riziko kardiovaskulárních chorob (Simopoulos, 2005).

Oproti tomu eikosanoidy odvozené od kyseliny α -linolenové z řady n-3 mají na organismus pozitivní vliv, udržují rovnováhu vnitřního prostředí organismu – homeostázu, působí jako prevence proti vzniku kardiovaskulárních onemocnění, podporují protizánětlivé pochody, mají antiarytmické účinky, snižují riziko vzniku trombózy rozšiřováním cév – vazodilatací a zlepšováním plasticity membrán buněk především erytrocytů, potlačují riziko vzniku rakoviny a autoimunitních onemocnění (Das, 2006). Metabolity, odvozené od EPA a DHA, jsou prekurzory prospěšných tromboxanů typu A3 nebo leukotrienů B5. Mají příznivý vliv na celou řadu chronických onemocnění, jako jsou psoriáza, atopická dermatitida, zánětlivá artritida, astma nebo nespecifické záněty střev (Žák *et al.*, 2005).

Protektivní působení DHA na vlastnosti biologických membrán je sledem překrývajících se mechanismů pozměněné zánětlivé odpovědi a kontroly genové exprese. Přímé účinky DHA na buněčné membrány souvisí se změnou biofyzikálních vlastností membrán a s modulací syntézy fosfatidylserinu, vyvolanou přítomností esterifikované DHA v aminofosfolipidech. Změny v zánětlivé odpovědi organismu se projeví vzájemnou soutěží mezi kyselinami AA a EPA o enzymy účastnící se biosyntézy eikosanoidů (Komprda, 2012). DHA v neesterifikované formě je také prekurzorem pro syntézu protizánětlivých resolvinů jako je například neuroprotektin D1 (NPD1), který se účastní indukce exprese neuroprotektivních a antiapoptotických genů. Dále se EPA i DHA účastní regulace exprese genů pomocí retinálních a peroxisomálních proliferačních signálních drah, ovlivňující iontové kanály buněk a zvyšující endogenní antioxidační systémy (Klusáčková a Skoumalová, 2012).

3.4 Zánětlivá reakce organismu

Zánět (Inflammati) je komplexní reaktivní proces u vyšších organismů ve vztahu k eliminaci a reparaci následků působení různých nefyziologických vlivů (stimulů či škodlivých faktorů), doléhající na organismus ze zevního eventuálně z vnitřního prostředí, které přesahují fyziologické adaptační nebo kompenzační možnosti organismu. Popisně lze zánět definovat jako komplex sukcesivně či simultánně vznikajících alternativních, exsudativních, proliferativních a imunitních dějů, jakožto reakce organismu na různorodé škodliviny, doléhající z vnitřního nebo vnějšího prostředí. Zánět jako proces vede k likvidaci a eliminaci patogenetického činitele a k reparaci následků poškození organismu (Kod'ousek, 2012). V případě zánětu hraje důležitou roli imunita organismu. Zánětlivá reakce je forma projevu imunitní odpovědi organismu, na základě vzájemné interakce dílčích komponent imunitního systému, jako jsou specifické a nespecifické imunitní mechanismy. Mezi základní imunitní mechanismy uplatňující se v patogenezi zánětu exsudativního, patří uvolnění mediátorů zánětu, látek, které vedou k vazodilataci cév, zvýšení permeability endotelu, vytvoření edému a následného exsudátu, k nimž řadíme histamin, serotonin, eikosanoidy-prostaglandin typu E2 a prostacyklin, které jako metabolity AA vyvolávají zánětlivou vazodilataci, zvyšují teplotu organismu (horečku), bolest a zvyšují účinnost chemotaktických a permeabilních mediátorů (Baker *et al.*, 2011). Mezi chemické mediátory zánětu proliferativního řadíme cytooxigenázový produkt (LTB4), interleukiny (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) a (TNF- α), které jsou produkovány leukocyty a makrofágy (Kod'ousek, 2012).

Významnou roli v systému vrozené i získané imunity organismu hraje jaderný faktor kappa B (NF- κ B), který je schopen aktivovat prozánětlivé geny a tím spouštět zánětlivou reakci organismu (Alberts *et al.*, 2008). Oproti tomu rodina jaderných receptorů PPAR, které fungují jako antagonisté NF- κ B, eliminují mediátory zánětu, snižují bolest a otok a inhibují uvolňování prozánětlivých molekul (Sandeep *et al.*, 2011).

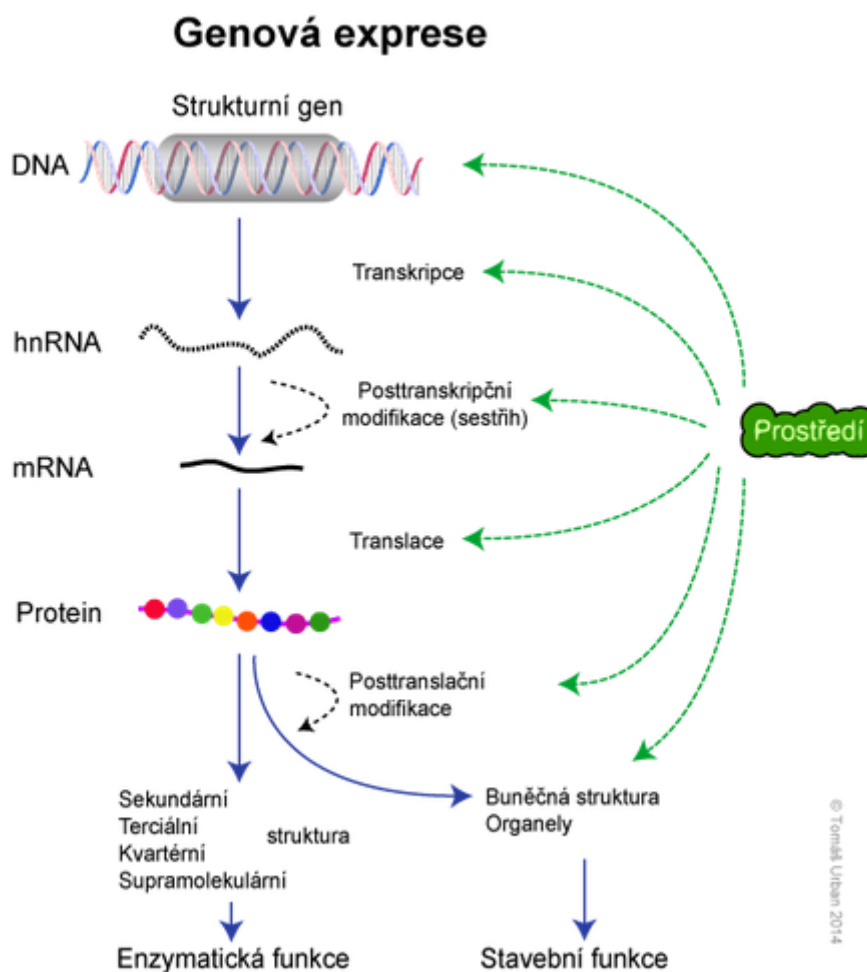
Mikrobiální infekce nebo poškození tkáně spouští zánětlivou reakci, která se vyznačuje přílivem leukocytů do místa vstupu infekce, zarudnutím, bolestí, otokem. Makrofágové a mononukleární fagocytární leukocyty poskytují první obrannou linii proti invazi mikroorganismů (MO) spuštěním kaskády zánětlivé reakce. Zánětlivá kaskáda začíná příjmem signálu z extracelulárních receptorů buněk v místě poškození

nebo vstupu infekce, které vedou k uvolňování cytokinů, které odhalí krevní cévy pro adhezivní molekuly. Ty usnadňují vstup leukocytům do tkáně a stimulují povrchové buněčné receptory, které iniciují kaskádu k aktivaci NF- κ B v místě infekce. NF- κ B řídí expresi cílových genů, které zprostředkovávají buněčnou proliferaci, uvolňují antimikrobiální molekuly a cytokiny pro aktivaci dalších makrofágů, které odstraní odumřelé buňky (Hyden a Gosh, 2008). Pro zachování zdraví organismu je důležité ukončení zánětlivé odpovědi.

3.5 Genová exprese, transkripční faktory, jaderné receptory

Zkoumáním vlivu složek potravy na modulaci genetické informace uložené v DNA a jejími projevy v organismu, tedy genovou expresí, se zabývá relativně mladý vědní obor zvaný nutrigenomika. Využívá znalosti a technologie genomiky, aby odhalila, jak účinné složky obsažené v potravě mohou ovlivňovat genovou expresi a metabolismus organismů.

Dědičná informace je sekvence nukleotidů uvnitř molekuly DNA, která je uložená v jádrech buněk, ale i v mitochondriích nebo plazmidech u prokaryot. Genová exprese je proces, při kterém je dědičná informace uložená v DNA převedena do struktury proteinu (obr. 6). Genová exprese je proces, při kterém buňky konvertují informaci v sekvenci DNA do sekvence mediátorové RNA (mRNA), označováno jako proces transkripce a následně je informace dekódována do sekvence aminokyselin, označováno jako proces translace (Urban, 2014). Genovou expresí u eukaryotických buněk lze regulovat na několika úrovních. Na úrovni transkripce neboli přepisu z DNA do mRNA, na úrovni posttranskripčních úprav, nebo na úrovni translace, což je překlad dědičné informace z mRNA do struktury proteinů.



Obr. 6 Genová exprese (Urban, 2014)

Transkripce je složitý, enzymaticky katalyzovaný a autoregulovaný proces, který probíhá v buněčném jádře. Transkripce má několik stupňů (iniciace, elongace, terminace), je katalyzovaná enzymy například RNA polymerázou, za účasti mnohých transkripčních faktorů (TF). Transkripce eukaryotických genů je regulována interakcemi mezi proteiny a sekvencemi DNA uvnitř nebo poblíž genu (promotorové sekvence, TF, zesilovače transkripce neboli enhancerové sekvence), (Janečková a Vašíčková, 2015).

TF jsou proteiny, regulující přepis genů a účastnící se regulace genové exprese vazbou na specifická místa v DNA. Prostřednictvím TF je genová exprese přizpůsobena konkrétním potřebám buňky, umožňuje unikátní expresi každého genu v různých typech buňky a během vývoje. TF jsou nezbytné pro regulaci exprese genů, jsou tedy přítomny ve všech živých organismech (Alberts *et al.*, 2008).

Počet TF v organismu je přímo úměrný velikosti genomu daného druhu. TF je možné rozdělit na obecné a specifické. Obecné TF se vyskytují ve všech typech buněk, zatímco specifické TF jsou přítomny jen v určitých typech buněk (Janečková a Vašíčková, 2015). TF mají schopnost regulovat svoji vlastní tvorbu negativní zpětnou vazbou, kdy se naváží na DNA vlastního genu. Jsou lokalizovány v cytoplazmě poblíž jádra nebo v jádře buněk. Obsahují četné jaderné lokalizační signály, většina TF se však před přemístěním do jádra musí nejprve navázat na ligand. Vazbou TF na ligand je ovlivněna jeho aktivace, nitrobuněčná lokalizace i schopnost vazby na DNA nebo na jiné kofaktory. Spojení TF s DNA probíhá vodíkovými můstky nebo interakcí pomocí Van der Waalsových sil. Z hlediska funkčního dělení můžeme TF rozdělit na konstitutivní TF, které jsou přítomné a aktivní v buňce po celou dobu například jaderný faktor 1 (NF1) nebo CAAT box, a podmíněně aktivní, kdy je nutná jejich dodatečná aktivace. Podmíněně aktivní TF můžeme dále dělit na vývojové neboli buněčně specifické, které však po expresi již nepotřebují další aktivaci například hepatocytární nukleární faktor (HNF). A signál-dependentní TF, které ke své aktivaci potřebují signál z vnějšího prostředí. Signál-dependentní TF lze dále dělit dle místa výskytu na extracelulární ligand-dependentní TF, tvořené jadernými receptory, intracelulární ligand-dependentní TF, které se aktivují malými molekulami p53 nebo SREBP, dále TF závislé na receptoru buněčné membrány, aktivované kaskádou s druhým poslem, způsobující fosforylaci TF (Alberts *et al.*, 2008). Tyto TF závislé na receptoru buněčné membrány lze dále dělit na rezidentní jaderné faktory, které jsou přítomny v jádru bez ohledu na aktivaci ligandem, dále TF jaderné membrány, například rodina nukleárních receptorů PPAR, označována jako nukleární receptory typu II a latentní cytoplazmatické faktory, které se nacházejí v cytoplazmě v neaktivní formě, po aktivaci ligandem jsou translokovány do jádra například NF- κ B, které jsou klasifikovány jako nukleární receptory typu I (Alberts *et al.*, 2008).

3.5.1 Nukleární receptory PPAR

PPAR jsou receptory aktivované peroxizomovými proliferátory, objevené v roce 1990, které patří do skupiny receptorů jaderné membrány (Latruffe a Vamecq, 1997). Fungují jako ligandem aktivované transkripční faktory, regulací cílových genů se podílejí na řízení metabolismu lipidů, buněčné diferenciaci a apoptóze. Tato rodina nukleárních receptorů zahrnuje 3 izotopy: PPAR α , PPAR δ (β) a PPAR γ , které se od sebe odlišují

funkcí i mírou exprese v různých tkáních (Schoonjansk *et al.*, 1996). Název této skupiny látek byl odvozen od jejich schopnosti stimulovat proliferaci peroxizomů.

Peroxisomy jsou buněčné organely, které mají zásadní význam při β -oxidaci delších a rozvětvených mastných kyselin, syntéze MK, metabolismu lipoproteinů, syntéze cholesterolu, žlučových kyselin, strukturních lipidů a dalších významných procesů (Šmahelová, 2004). PPAR ovlivňují expresi řady genů souvisejících s metabolismem lipidů a sacharidů, s regulací zánětu, nádorového bujení, imunitní odpovědi, buněčné diferenciaci, proliferace a apoptózy (Sandeep *et al.*, 2011).

PPAR α je transkripční faktor, který se podílí na proliferaci peroxizomů, snižováním hladiny triacylglyceridů reguluje lipidový metabolismus, a tím například snižuje dislipidémii spojenou s metabolickým syndromem. Dále se podílí na regulaci zánětlivých reakcí endotelových buněk, má vliv na patogenezi aterosklerózy a je zapojen do regulace homeostáze energie (Lee *et al.*, 2003). K expresi tohoto izotopu dochází nejčastěji v játrech, ledvinách, srdeční svalovině, trávicím traktu, v pomocných buňkách nervové tkáně v astrocytech nebo mikroglíích, nebo v imunitních buňkách - makrofázích nebo monocitech a v příčně pruhované kosterní svalovině (Schoonjansk *et al.*, 1996). V játrech, hraje PPAR α klíčovou roli při oxidaci MK, které poskytují energii pro periferní tkáně, zvyšuje míru mitochondriální a perioxozomální β -oxidace v jaterní tkáni, ledvinách, sítnici nebo v hnědé tukové tkáni. Má potencionální úlohu v oxidační a antioxidační dráze (Lefebvre *et al.*, 2006).

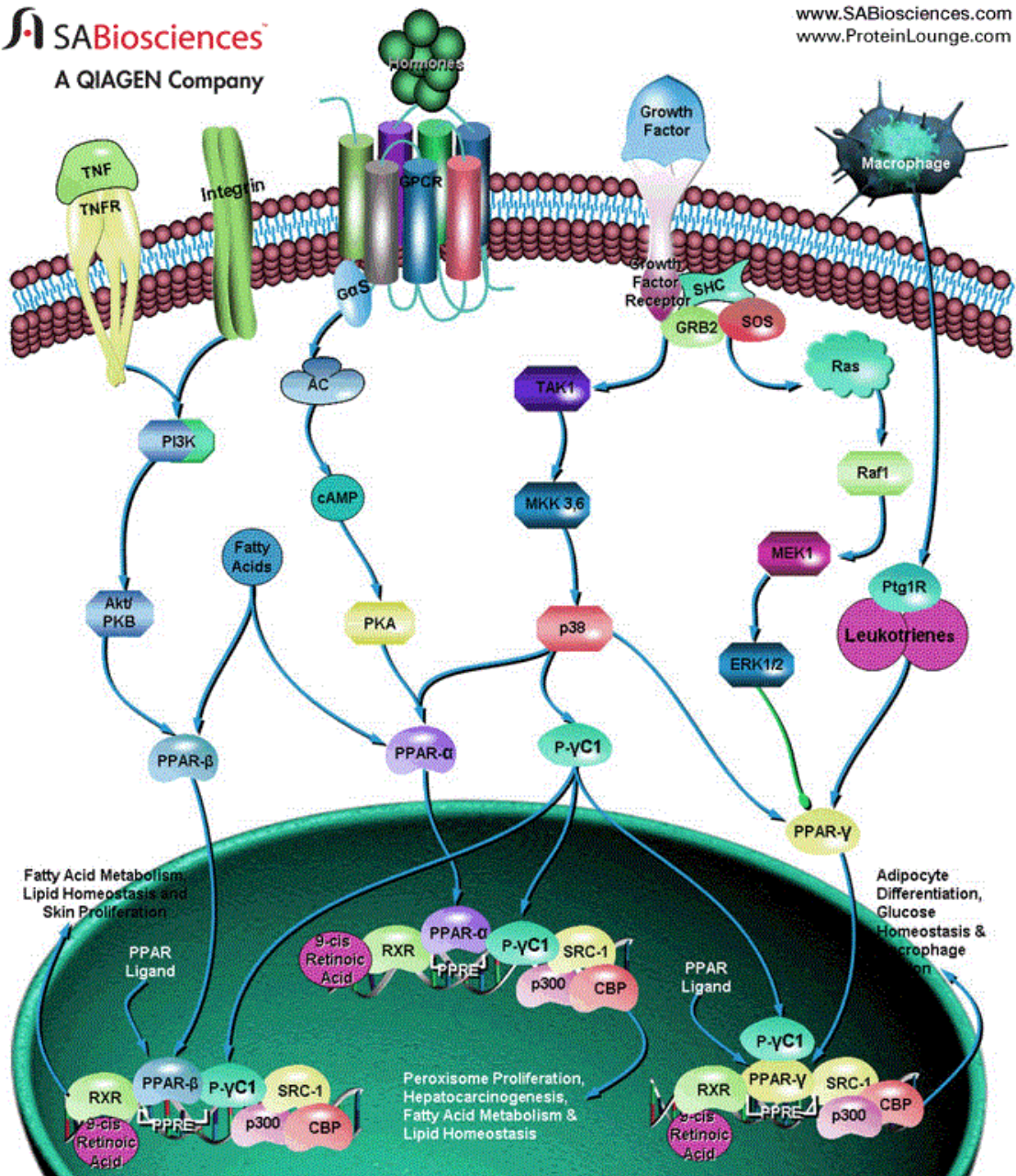
K expresi PPAR δ/β dochází v kosterní svalovině, tukových buňkách, plicích, mozku, kůži a makrofázích, avšak míra exprese se v různých tkáních liší. K nejvyšší expresi dochází ve slezině, nervové tkáni, tenkém stěvě, plicích a v makrofázích (King, 2016). PPAR δ snižuje expresi zánětlivých mediátorů a adhezních molekul, což vede k potencionální roli v tlumení aterogeneze (Graham *et al.*, 2005). Ligandy PPAR δ mají potenciál inhibovat například srdeční hypertrofii, díky jejich schopnosti inhibovat transkripční faktor NF- κ B, který produkuje zánětlivé cytokiny (Balakumar *et al.*, 2007). Tato izoforma je schopná regulace diferenciaci keratinocytů, apoptózy i proliferace buněk, zánětu i hojení ran (Lefebvre *et al.*, 2006).

PPAR γ je přítomný téměř ve všech tkáních a je nevýznamnějším regulátorem metabolismu lipidů, ovlivňuje diferenciaci tukové tkáně, podílí se ukládání triacylglyceridů (Schoonjansk *et al.*, 1996). Zvyšuje inzulínovou senzitivitu, reguluje zánětlivou reakci, má vliv na kardiovaskulární onemocnění například srdeční hypertrofii nebo selhání činnosti srdce, hypertenzi nebo aterosklerózu. PPAR γ je receptorem pro

ligandy PUFA a thiazolidindiony, které patří k nejčastěji studovaným ligandům PPAR γ (Lee *et al.*, 2003). PPAR γ se dále dělí na 4 izoformy:

- PPAR γ 1 – exprimován ve všech tkání v organismu
- PPAR γ 2 – exprimován převážně v tukové tkáni, strukturálně je o 30 aminokyselin (AMK) delší než ostatní izoformy
- PPAR γ 3 – exprimován v makrofázích, tlustém střevě a bílé tukové tkáni
- PPAR γ 4 – exprimován v endotelových buňkách

PPAR γ hraje důležitou roli v imunitních odpovědích organismu, prostřednictvím své schopnosti inhibovat expresi zánětlivých cytokinů a řídit diferenciaci imunitních buněk směrem k protizánětlivým fenotypům. Díky strukturální rozmanitosti ligandů, které se na něj váží, je schopen působit proti stále více se rozšiřujícím alergiím a zánětům (Sandeep *et al.*, 2011). PPAR γ reguluje expresi řady genů, podílejících se na metabolismu lipidů, jako jsou AP2, PPCK, acyl-CoA syntáza. Řídí také expresi FATP nebo CD36 a všechny tyto molekuly mají PPAR-responzivní elementy (PPREs) v rámci svých regulačních oblastí (obr. 7). PPAR γ reguluje růst a proliferaci adipocytů, spolu s izoformou PPAR β se zapojují do molekulární signalizace, která zprostředkovává diferenciaci adipocytů. Aktivace PPAR γ inhibuje proliferaci maligních buněk odvozených od liposarkomu, adenokarcinomu prsu, karcinomu prostaty, kolorektálního karcinomu, karcinomu plic, slinivky, močového měchýře, žaludku a gliových nádorů v mozku (Chattopadhyay *et al.*, 2000).



Obr. 7 Signální dráhy rodiny nukleárních receptorů PPAR (převzato z Qiagen, dostupné z: <http://www.sabiosciences.com/iapp/ppar.html#animdemo-ppar>)

PPAR vytváří heterodimery s tolerančními retinoidními X receptory, tento komplex může regulovat expresi genů buď po navázání PPAR ligandů nebo RXR ligandů (Flock *et al.*, 2013). PPAR/RXR se váží k PPAR-responzivním elementům (PPREs) v cílové DNA, které jsou složeny z přímých repetitivních, rozpoznávací motiv AGG (/ TA) CA v odstupu o 1 nebo 2 páru bází (Sandeep *et al.*, 2011) označených (DR-1) nebo (DR-2), (Schoonjans *et al.*, 1996). Struktury těchto PPAR domén jsou kanonické, podobné jako u jiných členů rodiny jaderných receptorů transkripčních regulátorů, každý PPAR má na

DNA vazebnou doménu (DBD), uloženou na amino-koncové části s transaktivační funkcí (AF-1) a doménu vázající ligand (LBD) s transaktivací ligand-dependentní funkcí (AF-2), umístěnou na karboxy-koncové oblasti, které jsou velmi konzervativní (Sandeep *et al.*, 2011). LBD receptoru PPAR může navázat celou řadu endogenních lipidů, jenž zahrnuje MK, eikosanoidy například 15- deoxy-12, 14- prostaglandin J2, který je ligandem PPAR γ 2 receptoru (Latruffe a Vamecq, 1997) a dále například deriváty kyseliny linolové (King, 2016).

Komplexy heterodimerů PPAR/RXR jsou přítomné v jádře, vázané na PPREs v promotorech cílových genů, jenž vede k transaktivaci a transrepressi různých genů (Flock *et al.*, 2013). V nepřítomnosti ligandu jsou v komplexu s transkripčními korepresory například utlumující mediátor kyseliny retinové, receptor thyroïdního hormonu a nukleárního receptoru co-repressor (N-CoR), které blokují transkripci genů (Michalic a Wahil, 2006; King, 2016).

3.5.2 Jaderný faktor kappa B

Skupina transkripčních faktorů NF- κ B byla objevena v roce 1986 výzkumnou skupinou doktora Davida Baltimore a popsána jako B-lymfocytární jaderné faktory potřebné pro transkripci κ lehkých řetězců imunoglobulinů (Ig), (Sen a Baltimore, 1986). Jedná se o rodinu proteinů, které se nachází v cytoplazmě buněk v neaktivní formě, po aktivaci vstupují do jádra, kde se navazují na sekvenci DNA. Hrají důležitou roli v celé řadě buněčných procesů, jako jsou reakce na virové nebo bakteriální antigeny, stres, uvolnění mediátorů zánětu - cytokinů, působení volných radikálů, vliv ultrafialového záření nebo chemických podnětů na organismus. Obecně, dochází k jejich aktivaci v systémech vrozené i získané imunity, zánětlivých procesech i rakovinného bujení (Chen *et al.*, 2003). Jsou zapojeny do procesů diferenciaci a proliferace buněk i apoptotických mechanismů. Jsou schopny aktivovat prozánětlivé geny a tím iniciovat zánětlivou reakci v organismu savců (Pahl, 1999).

K rodině TF NF- κ B řadíme tyto proteiny: p105/50 (NF- κ B1), p100/52 (NF- κ B2), RelB, c-Rel, p65 (RelA), virový onkoprotein v-Rel (Hayden a Gosh, 2008), které se spojují v homo- či heterodimery, čímž vytváření regulační transkripční komplexu. Transkripční aktivita jednotlivých komplexů je dána složením jednotlivých proteinů v komplexu, dále závisí na buněčné lokalizaci, buněčném typu, na vazbě s inhibitorovými proteiny I κ B a jejich množství, charakteru indukujícího podnětu a

době jeho působení. Nejčastějším seskupením TF NF- κ B je heterodimer p50/p65 (Baker *et al.*, 2011).

Strukturálně proteiny NF- κ B obsahují konzervativní doménu RHD (Rel homology domain), která umožňuje tvorbu dimerů, vazbu inhibičních proteinů a vazbu na DNA. Je přítomna na N-terminálním konci, obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS), který je zodpovědný za translokaci komplexu do jádra a za iniciaci genové exprese (Kopp a Gosh, 1995). K aktivaci NF- κ B je potřeba, aby alespoň jeden protein v komplexu obsahoval transaktivační doménu (TAD), která je přítomna na C-terminálním konci. Aktivaci dimeru předchází fosforylace inhibitoru specifickou I κ B kinázou (IKK), která se nachází v cytoplazmě buněk a vykazuje serin-proteinkinázovou aktivitu (Matějčková, 2013). IKK se skládá z 3 podjednotek – heterodimeru IKK α /IKK β s katalytickou aktivitou a regulační podjednotky IKK γ (NEMO), (Macris *et al.*, 2002).

NF- κ B je hlavním zprostředkovatelem imunitní odpovědi v organismu. Ke správné funkci tohoto faktoru je zapotřebí přesná regulace na odlišné podněty. Vazbou ligandů na receptory buněk jako jsou například T-buněčné receptory (TCR), B-buněčné receptory (BCR), Interleukin 1 receptor (IL-1R), *Tumor necrosis factor* receptor (TNFR), B-buňky aktivující faktor receptor (B-cell activating factor receptor, BAFF-R), Toll-like receptor (TLR) spouští regulaci exprese cytokinů, chemokinů, růstových faktorů, imunoreceptorů, modulátorů angiogeneze, efektorových enzymů, adhezivních molekul a dalších například apoptotických faktorů (Matějčková, 2013).

Další úlohou TF NF- κ B je vliv na vývoj orgánu a tkání během embryonálního vývoje a embryogeneze i na růst tkání a vývoj orgánů v postnatálním vývoji. Zprostředkovává odpověď organismu na oxidativní i fyzický stres, i na působení chemických látek na organismus (Chen *et al.*, 2003).

Endogenní ligandy EPA a DHA inhibují signální dráhu NF- κ B (Calder, 2012).

3.5.2.1 Aktivace jaderného faktoru kappa B

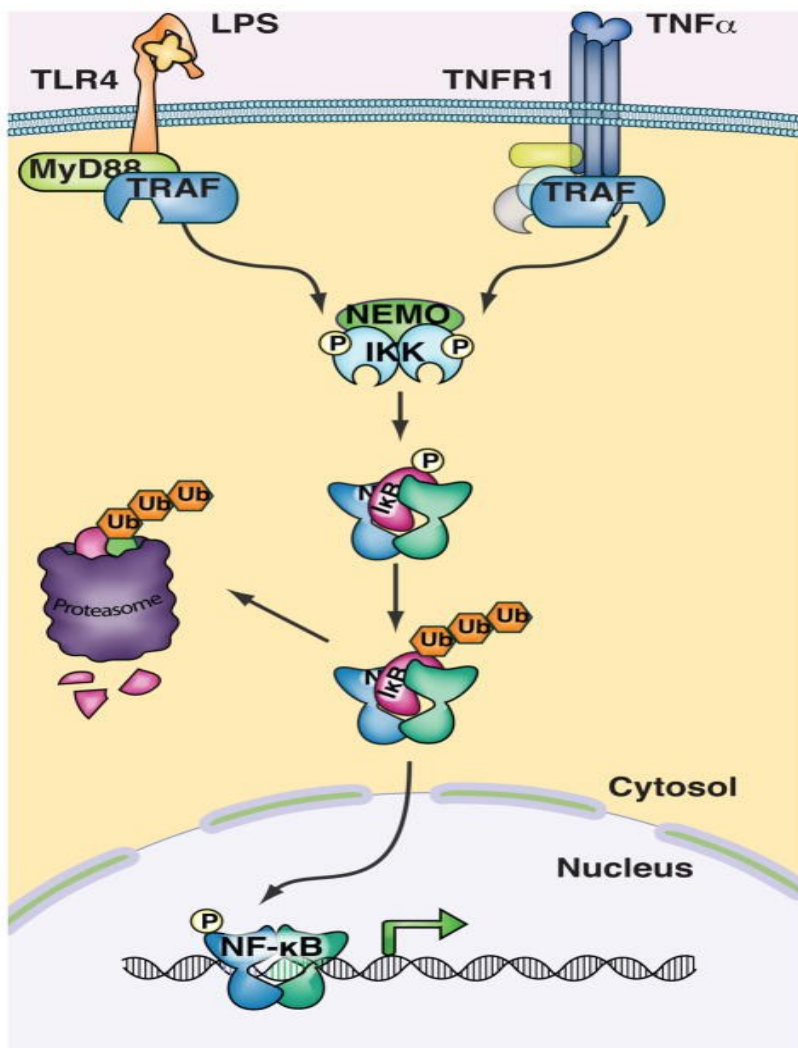
Proteiny NF- κ B jsou v buňkách asociovány s inhibičními proteiny rodiny I κ B, nejčastěji I κ B α , I κ B β , I κ B γ , Bcl-3, I κ B ϵ a jsou v cytoplazmě v inaktivním stavu. Inhibitory rodiny I κ B obsahují pěti až sedmi násobné repetice v rozsahu třiceti až třiceti-tří aminokyselin, které se váží na dimerizační podjednotku NF- κ B. Interakce inhibičních proteinů I κ B s proteiny NF- κ B je zprostředkována právě těmito repeticemi. Vazbou inhibičního proteinu I κ B na NF- κ B dochází k překryvu lokalizačního jaderného signálu (NLS) proteinu, tímto mechanismem je ovlivněna lokalizace NF- κ B

v buňce (Malek *et al.*, 2011). Některé inhibiční proteiny jsou schopné zakrýt pouze jednu podjednotku komplexu dimeru a inhibují NLS jen částečně, v důsledku čehož dochází k pomalejší migraci komplexu dimeru do jádra. Avšak inhibiční protein I κ B β dokáže zakrýt obě podjednotky dimeru najednou, a tím udržuje komplex stále přítomný v buněčné cytoplazmě (Tam a Sen, 2001; Malek *et al.*, 2001).

Inaktivní komplex NF- κ B - I κ B je stimulován řadou podnětů, jakými jsou prozánětlivé cytokiny TNF α , IL-1, mitogeny, proliferační faktory, lipopolysacharidy, stresory, volné radikály. Působením různých faktorů na buněčné receptory vyvolává aktivaci TF NF- κ B dvěma odlišnými cestami (Matějčková, 2013).

3.5.2.2 Klasická - kanonická aktivační dráha NF- κ B

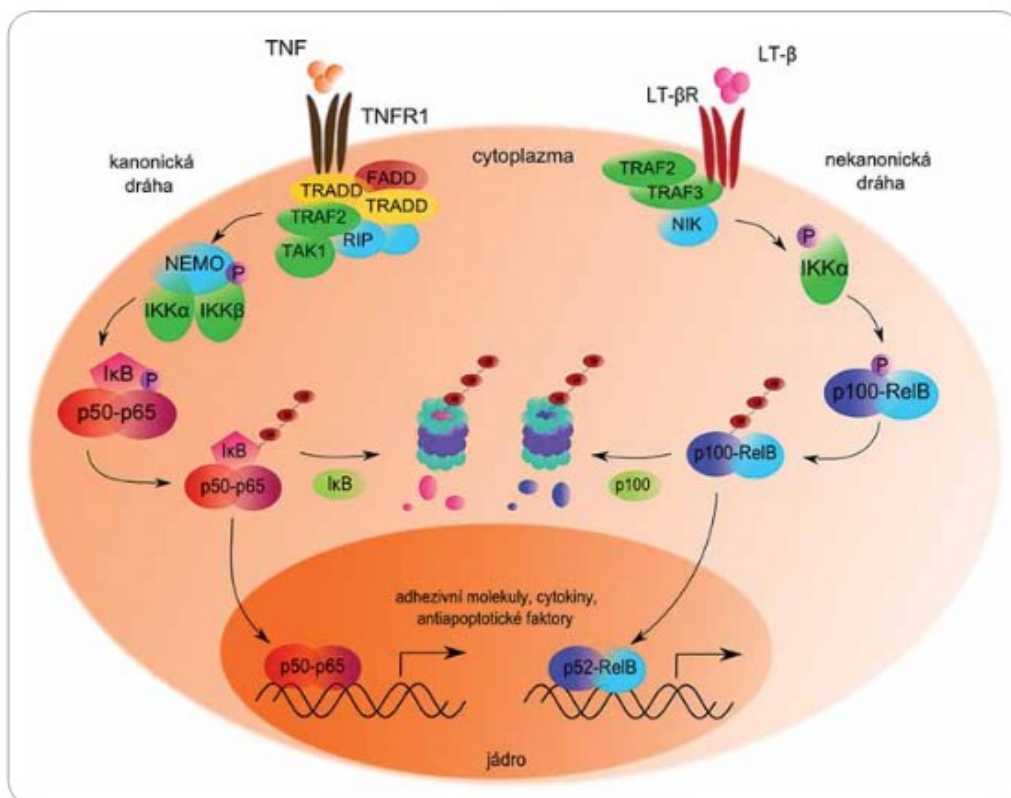
Klasickou signální cestou je inhibitorový protein I κ B α fosforylován na serinu v pozicích 32 a 36 podjednotkou specifické kinázy IKK β , která vede k polyubikvitinaci na lyzinu v pozicích 21 a 22. Tento fosforylovaný protein je rozpoznán a označen ubikvitin-ligázovým komplexem SCF/ β -TrCP, polyubikvitován a degradován proteazomem 26S (Kanarek a Ben-Neriah, 2012). Po odstranění inhibitoru je NF- κ B translokován do jádra a indukuje expresi více než padesáti různých genů, mimo jiné geny pro IL-6, IL-1, IL-2, TNF α , COX-2, ICAM-1, VCAM-1, XIAP, cIAP a mnoho dalších molekul souvisejících s onkogenezí (Pahl, 1999). Tímto způsobem je aktivovaný nejběžnější heterodimer proteinů p50/p65, nazývaný také jako specifický NF- κ B (Matějčková, 2013). Po uvolnění aktivních dimerů z komplexu s inhibičními proteiny, dochází k následným post-transkripčním úpravám dimerů NF- κ B nebo histonů cílových genů, mezi které patří forforylace nebo acetylace a určují délku trvání transkripční odpovědi NF- κ B (Greene a Chen, 2004). Jeho aktivační dráha je spojována se zvýšenou transkripcí genů kódující například inhibitory apoptózy (Lee *et al.*, 2002), adhezivní molekuly nebo chemokiny (Wilson *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001). Tato klasická aktivační dráha NF- κ B se uplatňuje v odpovědích na bakteriální a virové infekce, nebo při vystavení prozánětlivým cytokinům (TNF α , IL-1). Zajišťuje přežití zralých imunitních buněk při bakteriální infekci, nebo během akutního zánětu (obr. 8; Dejardin, 2006).



Obr. 8 Kanonická aktivační dráha NF-κB (Baker *et al.*, 2011)

3.5.2.3 Alternativní – nekanonická aktivační dráha NF-κB

Nekanonická aktivační dráha je založena na odlišném inhibitoru, kterým je prekurzorový protein p100, aktivace je zahájena fosforylací NF-κB-inducibilní kinázy (NIK) podjednotkou IKKα homodimeru. Aktivovaná NIK dále fosforyluje protein p100 (100kDa) na C-konci, jenž vede k jeho zkrácení proteolytickým štěpením v proteazomu 26S na protein p52 (52kDa). Výsledkem alternativní signální dráhy je transkripčně aktivní dimer p52/RelB, který je translokován do jádra (Ramakrishnan *et al.*, 2004). Tuto aktivační dráhu aktivují CD40, CD30, CD27, receptor aktivátor NF-κB (RANK), lymfotoxin β receptor (LBR). Nekanonická signální dráha zabezpečuje udržování a vývoj sekundárních lymfatických orgánů (obr. 9; Dejardin, 2006).



Obr. 9 Kanonická a nekanonická aktivační dráha NF-κB (Matějčková *et al.*, 2013)

3.5.3 Sterol regulační element vázající protein (SREBP)

Sterol regulační element vázající proteiny (SREBP) jsou rodinou transkripčních faktorů, které regulují homeostázu lipidů, řízením celé řady enzymů souvisejících se syntézou cholesterolu, MK (Wang, 1994), triacylglyceridů a fosfolipidů (Eberle *et al.*, 2004).

SREBP existuje ve třech izoformách SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2, každá z nich má při syntéze lipidů různou roli (Goldstein *et al.*, 2006). SREBP-1a aktivuje syntézu MK a cholesterolu, SREBP-1c se účastní syntézy MK a inzulínem indukovaný metabolismus glukózy, zejména lipogenezi (Eberle *et al.*, 2004). SREBP-2 se podílí na syntéze cholesterolu a jeho vychytávání (Goldstein *et al.*, 2006).

SREBP jsou syntetizovány jako neaktivní prekurzory vázané na membrány endoplazmatického retikula (ER). Po aktivaci prochází sekvenčním dvou-stupňovým procesem štěpení k uvolnění NH₂-termální aktivační domény v jádře (nSREBPs). Proces je kontrolován obsahem sterolů v buňce. Při snížení hladiny sterolů v intracelulárním prostoru dochází ke štěpení prekurzoru, který indukuje aktivaci genů pro syntézu cholesterolu a zodpovídá za udržování homeostázy cholesterolu. Tento

proces vede k syntéze izoform SREBP-1a a SREBP-2, nikoliv však k syntéze izoformy SREBP-1c, která je regulována na transkripční i translační úrovni inzulinem (Eberle *et al.*, 2004). Jako TF se váže na sterol regulační element DNA k sekvenci TCACNCCAC, u savců jsou SREBP kódovány dvěma geny *SREBF1* a *SREBF2* (Shao a Espenshade, 2012).

3.5.4 Receptor spřažený s G-proteinem (GPR120)

Receptor spřažený s G-proteinem je kódován genem *GPR120* a v savčím organismu je receptorem pro dlouhé řetězce omega-3 MK (Hirasawa *et al.*, 2005), který zprostředkovává potencionální senzitivitu k inzulinu, vykazuje anti-diabetický efekt, potlačením makrofágy indukovaném zánětu ve tkáni. Aktivací *GPR120* spouští široké spektrum protizánětlivých účinků v primárních monocytárních RAW 264,7 buňkách a intraperitoneálních makrofázích (Oh *et al.*, 2010).

Receptory spřažené s G-proteinem (GPCR) přijímají signalizační molekuly ovlivňující mnohé aspekty buněčné funkce. Patří k rodině společných strukturních motivů, jako je sedm transmembránových šroubovic, které jsou schopné aktivovat heterodimerní G-proteiny (*Gai*, *Gas*, *Gaq*). Ligandy se specificky váží na GPCR a tím iniciují celou řadu buněčných odpovědí, před dráhy spojené s druhým poslem, jako jsou například modulace produkce cyklického adenosin monofostátu (cAMP), dráha fosfolipázy C, iotové kanály (Gether, 2000). Podle studie Hirasawa *et al.* (2005), aktivací *GPR120* dlouhými řetězci MK navyšuje koncentraci Ca^{2+} iontů a spouští ERK kaskádu, což naznačuje interakci s rodinou *Gaq* z G-proteinů.

Podle Oh *et al.*, dochází k vysoké exprimaci *GPR120* v tukové tkáni a ve zralých adipocytech, dále také v prozánětlivých makrofázích nebo hepatocytech (Hirasawa *et al.*, 2005). Působení DHA a EPA na *GPR120* vykazuje silné protizánětlivé účinky.

3.5.5 Hormon Adiponektin

Adiponektin, hormon tukové tkáně produkovaný adipocyty, byl poprvé objeven v roce 1995 u myši jako sekreční protein Acrp30 několika na sobě nezávislými výzkumnými skupinami. U člověka byl adiponektin charakterizován o rok později a označen jako APM1 (Scherer *et al.*, 1995).

Tuková tkáň vykazuje hormonální aktivitu. Produkce adipocytokinů uvolňovaných do krevní plazmy ovlivňuje okolní tkáň (Maeda *et al.*, 1996). Adiponektin,

produkovaný adipocyty převážně bílé tukové tkáně, je specifický protein o hmotnosti 30kDa, který moduluje metabolismus mastných kyselin a glukózy. Adiponektin cirkuluje v krevní plazmě buďto ve formě volné molekuly nebo ve formě oligomerů či krátkých parciálních fragmentů. Oligomery adiponektinu jsou tvořeny trimerickými, hexamerickými nebo polymerními formami a vykazují rozdílné účinky na cílové tkáně. Adiponektin působí na cílové buňky pomocí specifických receptorů, které zahrnují 2 izoformy *AdipoR1* a *AdipoR2*. *AdipoR1* je exprimován převážně v kosterní svalovině, *AdipoR2* je exprimován v jaterních buňkách. Oba typy adiponektinových receptorů jsou složeny podobně jako receptory spřažené s G-proteinem ze sedmi transmembránových domén. Po vazbě adiponektinu na receptor dochází k inhibici NF- κ B enzymem AMP-aktivované proteinkinázou (AMPK), produkci glukózy jaterními buňkami nebo negativním účinkem na apoptózu cévního endotelu (Pajvani *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004). Strukturálně se adiponektin podobá struktuře cytokinu TNF- α , což dokazuje společný evoluční původ adiponektinu a cytokinů z rodiny TNF- α (Yamauchi *et al.*, 2003).

Hladinu adiponektinu v krevní plazmě ovlivňuje množství tukové tkáně v organismu. Mezi obsahem tuku v těle a hladinou adiponektinu v krevní plazmě je negativní korelace. U obezity, *diabetu melitu* II. typu a ischemické choroby srdeční je plazmatická hladina adiponektinu nízká, u *diabetu melitu* I. typu a *anorexie nervosy* je koncentrace vyšší (Maeda *et al.*, 2001; Haluzík *et al.*, 2003). Koncentraci adiponektinu snižuje působení glukokortikoidů, cytokinů TNF- α nebo β -adrenergních agonistů (Diez a Iglesias, 2003). Snížení hladiny adiponektinu vede k rezistenci buněk na inzulín a vzniku *diabetu melitu* II. typu, které jsou příčinami aterosklerózy. Zvýšení plazmatické koncentrace adiponektinu zvyšuje citlivost buněk na inzulín, stimuluje transport a využití glukózy, zvyšuje beta-oxidaci volných MK ve svalech, jaterních i tukových buňkách, snižuje plazmatické hladiny triacylglyceridů a inhibuje glukoneogenezi v játrech. Vyšší koncentrace adiponektinu působí anti-diabeticky, anti-aterogenně a protizánětlivě (Chen *et al.*, 2003). Dále stimuluje produkci cytokinů u makrofágů, potlačuje expresi adhezních molekul v buňkách cévního endotelu, podporuje růst nových cév, působí vasodilatačně, čímž zvyšuje průtok krve (Haluzík *et al.*, 2003; Housová *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2001). Hladinu adiponektinu lze zvýšit i podáváním thiazolidindionů (TZDs), které fungují jako syntetické ligandy PPAR γ . TZDs mají antagonistický účinek na TNF- α , stimuluje expresi a zvyšují sekreci adiponektinu (Maeda *et al.*, 2001; Diez a Iglesias, 2003).

Hladinu adiponektinu, který působí jako protizánětlivý hormon, modulují také endogenní ligandy DHA a EPA, jejichž vazbou na PPAR γ se jeho koncentrace zvyšuje (Siriwardhana *et al.*, 2013).

3.6.6 *ACTB* gen kódující β -aktin

Gen *ACTB* kóduje β -aktin, člena rodiny vysoce konzervativních proteinů - aktinů , které patří mezi jedny z nejrozšířenějších proteinů eukaryotických buněk. Aktin je součástí celulárních cytoskeletů a účastní se tak všech buněčných procesů, jako jsou buněčná dělení, regulace genové exprese, udržování integrity, struktury a pohyblivosti buněk. Aktin tvoří vlákna, která se rychle přizpůsobují potřebám buňky. U obratlovců existuje šest izoform aktinu, čtyři z nich jsou exprimovány ve hladké a příčně pružované svalovině, cytoplazmatické formy β -aktinu a γ -aktinu jsou exprimovány ve všech buňkách (Rubenstein, 1990).

β -aktin je protein o molekulové hmotnosti 42 KDa a je používán jako kontrola nanášení vzorků u molekulárně-genetických metod jako je PCR nebo Western-Blott.

3.6 Analýza proteinů imunochemickými metodami

Expese proteinů je měřena pomocí molekulárně-biologických a imunochemických metod. Nejčastějšími metodami používanými pro separaci proteinů a následné porovnání míry exprese proteinů je elektroforéza SDS-PAGE + imunoblott neboli Western-Blott (Labguide, 2017). Dále lze proteiny detekovat metodou ELISA, průtokovou cytometrií nebo multiplexovou analýzou. K detekci specifických proteinů a stanovení sekvence aminokyselin slouží hmotnostní spektrometrie systém MALDI nebo ESI. Vizualizaci nebo detekci proteinů lze uskutečnit i pomocí metod imunohistochemie nebo dalších hybridizačních metod, využívající vazbu antigen-protilátka například proteinové mikroarray čipy. Ty fungují jako multianalytové senzory, průběh vlastní imunoreakce je obdobný jako u metody ELISA, detekční protilátky jsou značeny fluoroforem nebo peroxidázou, která zprostředkuje vznik chemiluminiscenční látky, která je vyhodnocena pomocí CCD-kamery (Káš *et al.*, 2006).

3.6.1 Western-Blott

Western-Blott je metoda používaná pro kvantitativní nebo semikvantitativní detekci specifického proteinu ve vzorku. Je tvořena třemi základními kroky:

1. Elektroforetická separace
2. Přenos separovaných proteinů
3. Detekce proteinů

1. Elektroforetická separace

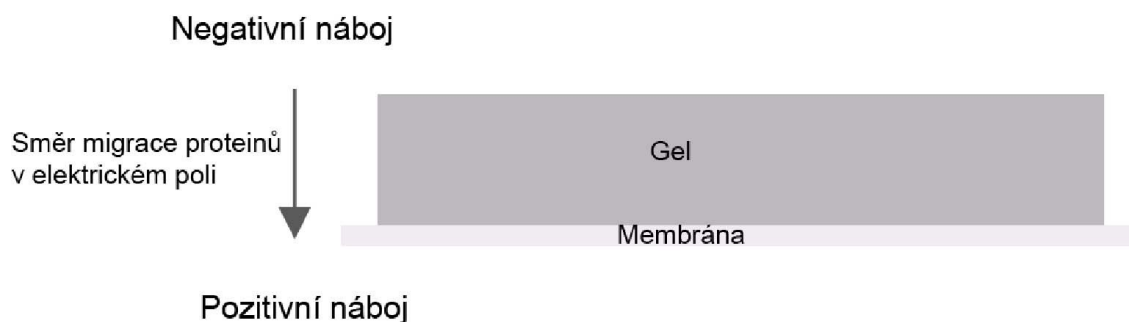
Pro separaci proteinů se používá gelová elektroforéza, nejčastěji SDS-PAGE (Dodecylsulfát sodný - polyakrylamidová gelová elektroforéza). Vlivem SDS denaturačního činidla jsou proteiny denaturovány, čímž proteiny získávají homogenní záporný náboj a cestují v elektrickém poli od katody k anodě. Jako další denaturační činidla lze použít merkaptoethanol nebo dithiotreitol a teplo. Při migraci v elektrickém poli jsou primární struktury proteinů separovány podle své molekulové hmotnosti, která se udává v jednotkách Daltonech (Da). 1 Da je roven molekulové hmotnosti atomu vodíku. Velikost napětí při SDS-PAGE je 8 V na cm vzdálenosti mezi elektrodami. Malé proteiny cestují akrylamidovým gelem rychleji, proteiny o velké molekulové hmotnosti se v gelu pohybují pomaleji. Pro separaci proteinů v nativní formě se používá metoda nativní-PAGE, při které jsou proteiny separovány na základě své celkové velikosti elektrického náboje molekuly proteinu. Náboj proteinu závisí na sekvenci aminokyselin v proteinu a post-translačních modifikacích. Většina proteinů má izoelektrický bod v oblasti kyselé či mírně zásadité, a tak migrují k zápornému pólu (Albert *et al.*, 2008).

Molekulová hmotnost jednotlivých proteinů je vyhodnocena na základě porovnání velikostí detekovaných proteinů s komerčně dostupnou směsí proteinů o známé velikosti tzv. proteinovým markerem molekulových hmotností. Pro kvantifikaci proteinu se aplikuje nanášecí kontrola, která je formou protilátky proti strukturálnímu proteinu. Nejčastěji se jako nanášecí kontrola neboli housekeepingový protein používá aktin, tubulin nebo glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH). Expres strukturálních proteinů by měla být u všech testovaných vzorků vždy stejná neboli výsledná intenzita signálu po imunodetekci by měla být u všech testovaných vzorků jednotná (Káš *et al.*, 2006).

2. Přenos separovaných proteinů

Pro přenos testovaných proteinů z gelu na membránu se obvykle využívá elektrického proudu, pomocí elektroforetického transferu neboli elektroblotu. Membrány jsou z materiálu nitrocelulózy nebo polyvinylu (PVDF), (Labguide, 2017).

ELEKTROBLOTOVÁNÍ



Obr. 10 *Elektroblotování (převzato a upraveno z Labguide, dostupné z: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>)*

Membrány používané u metody Western-Blot vykazují vysokou afinitu k proteinům, tedy i k protilátkám. Je nutné, aby se protilátky při inkubaci s membránou specificky navázaly ke svým antigenům na vzorcích. Provádí se tedy tzv. blokování membrány v blokovacích roztocích, které obsahují sušené odtučněné mléko nebo 1-5 % BSA (bovinní sérum albumin), které zaplní volná místa na membráně, čímž se docílí vazby protilátky na antigen. V průběhu procedury je nutné promývání membrány promývacími roztoky, nejčastěji TBS (tris-borátovými) nebo PBS (fosfátovými) roztoky, které odstraňují pozadí, které se vytváří vazbami nespecifických protilátek a zajišťují tak čistotu signálu.

3. Detekce proteinů

Pro vizualizaci detekovaných proteinů se používá barvení vzorků. Nejčastěji jsou proteiny barveny barvicí směsí Coomassie blue, jež obsahuje 0,25 % Coomassie blue R250 v 10% kyslině octové nebo 50% methanolu. Proteiny barvíme přímo v gelu po jejich elektroforetické separaci a barva na proteinech zůstává navázaná. Citlivost barvení pomocí Coomassie blue není příliš velká, detekční limit je 0,3-1 μg proteinu v proužku. Dalšími možnostmi barvení je barvení pomocí Ponceau S nebo Ponceau S red, které se provádí oproti Coomassie blue až po transferu proteinů na membránu a je reverzibilní (Labguide, 2017).

Přítomnost specifického proteinu na membráně je detekována pomocí protilátky. Primární protilátka se navazuje na protein a je detekována sekundární protilátkou. Přítomnost sekundární protilátky je detekována fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně, a to v závislosti na značení, které sekundární protilátka nese.

Sekundární protilátka je značená značkou například biotinem, nebo konjugovaná s reportérovým enzymem umožňující vizualizaci například křenová peroxidáza (HPR) nebo alkalická fosfatáza (AP). Sekundární protilátka musí být vždy proti (anti-) primární protilátce a musí pocházet z jiného organismu, než ve kterém byla připravena a izolována primární protilátka (Albert *et al.*, 2008).

Detekci proteinů můžeme provést i chemiluminiscenčně, kdy enzym reaguje s chemiluminiscenčním substrátem za vzniku nestabilního produktu, který se stabilizuje vyzářením kvanta světla a vzniká tak chemiluminiscenční signál, který se snímá CCD-kamerou. Množství signálu je tak přímo úměrné navázanému enzymu, který odpovídá úměrnému množství detekovaného proteinu (Káš *et al.*, 2006).

3.6.2 ELISA

ELISA z anglického předkladu Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay je heterogenní enzymová imunoanalýza, která patří v současnosti mezi jednu z nejdůležitějších a nejčastěji používaných analytických metod v molekulární biologii a medicíně, zejména v imunologii. Využívá se při detekci hladin protilátek, k detekci virových infekcí (hepatitida typu B a C, HIV-1, HIV-2, pohlavně přenosné choroby), k detekci hladin hormonů například HCG v těhotenství, T3, T4, TSH, LH a k detekci prozánětlivých markerů v krvi například cytokinů. Její výhodou je 96 jamková titrační mikro-destička, která umožňuje analýzu velkého počtu vzorků najednou a umožňuje detekci i velmi nízkých koncentrací látek o hmotnostech řádově 10^9 - 10^{12} g. Polystyrenová titrační mikro-destička umožňuje plnou automatizaci procesu analýzy. Kvantifikace látek je prováděna detekcí intenzity zbarvení jamek mikro-titrační destičky pomocí spektrofotometru, tedy detekcí absorbance příslušné vlnové délky. Metoda ELISA má několik uspořádání ke stanovování antigenu:

1. Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza
2. Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza
3. Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza

1. Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza

Nejprve interaguje protilátka ukotvená na pevném nosiči s antigenem v analyzovaném vzorku. Po ustanovení rovnováhy je systém promyt a ve druhé fázi se na protilátkou zachycený antigen naváže druhá protilátka, která je značená enzymem. Po promytí se

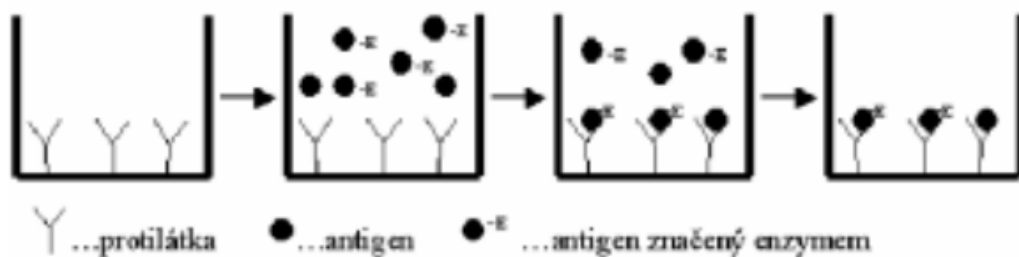
měří enzymová aktivita zachycená zprostředkovaně na pevnou fázi (obr. 11; Albert *et al.*, 2008).



Obr. 11 *Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza (převzato a upraveno, Káš et al., 2006)*

2. Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza

Protilátka zakotvená na pevný nosič interaguje současně s antigenem ze vzorku i se značeným antigenem, který soutěží s neznačeným antigenem o omezené množství vazebných míst na protilátkách. Po ustanovení rovnováhy je systém promyt a enzymová aktivita zachycená zprostředkovaně na pevné fázi se změní. Zde platí, čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek, tím nižší je naměřená enzymová aktivita a naopak (Obr. 12).

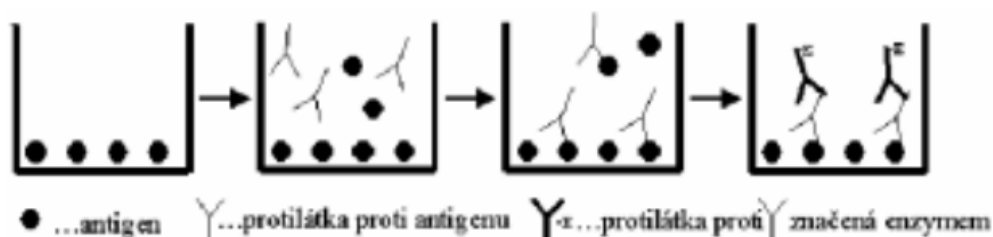


Obr. 12 *Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza (převzato a upraveno, Káš et al., 2006)*

3. Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza

První část analýzy je kompetitivní. Antigen ukotvený na pevném nosiči soutěží s nezakotveným antigenem ze vzorku, který má být stanoven, o omezený počet

vazebných míst na molekulách protilátky, přidávané do systému ve formě roztoku. Platí, čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen a naopak. Po ustanovení rovnováhy a promytí je zjišťováno množství zprostředkovaně zakotvené protilátky v další fázi nekompetitivní analýzy. K tomu je použita značená protilátka proti protilátce aplikovaná v první části analýzy (Obr. 13). Výhodou oproti přímé imunoanalýze je univerzální použití značené protilátky při stanovení jakéhokoliv analytu touto technikou (Káš *et al.*, 2006).



Obr. 13 Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza (převzato a upraveno, Káš *et al.*, 2006)

3.6.3 Multiplexová analýza na mikrokuličkách – technologie Luminex xMAP

Metoda multiplexové analýzy na kuličkách se používá pro kvantitativní určení koncentrace proteinu, kompetitivní imunoanalýzu, receptor-ligandovou analýzu, analýzu DNA nebo RNA molekul, stanovování protilátek navázaných na antigen nebo stanovování biomarkerů v různých klinických materiálech. Umožňuje stanovení například exprese cytokinů, a tím umožňuje studium zánětlivé a imunitní reakce v organismu (Miliplex, 2017). Jedná se o kombinaci metod imunoanalytického stanovení a průtokové cytometrie. Metoda je založena na platu 100 nebo 96 polystyrenových nebo magnetických kuliček o velikosti 5,6 μ , které se od sebe liší vnitřním spektrálním kódem, vytvořeným kombinací dvou fluorescenčních barviv v různém poměru. Magnetické kuličky platformy Luminex umožňují jednoduší separaci během reakčních kroků, jejich plnou automatizaci na pipetovacích a promývacích přístrojích (Kingsmore, 2006).

Princip multiplexové analýzy je založen na specifických protilátkách navázaných na jednotlivé populace mikrokuliček. Jelikož jsou mikrokuličky rozlišeny spektrálním

kódem, mohou být kombinovány v analýze a umožňují stanovení teoreticky až sta analytů v reakční jamce. Množství stanovovaného proteinu je určeno na základě druhé protilátky značené fluorescenční molekulou a reakce probíhá na principu sendviče (Zhu a Snyder, 2003).

Dalšími typy multiplexové analýzy jsou metody proteinových (antibody) arrays nebo imunoblotu (Kingsmore, 2006).

Detekce probíhá na speciálním průtokovém cytometru – přístroj Luminex. Mikrokuličky z reakční jamky jsou nasáty do přístroje, kde protékají za sebou vlivem nosného proudu mezi dvěma lasery. Fluorescenční signál po excitaci prvním laserem určí spektrální kód kuličky, tedy druh měřeného analytu a fluorescenční signál po excitaci druhým laserem určuje množství druhé protilátky, tedy množství analytu (Zhu a Snyder, 2003).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Experimentální část

Experiment byl uskutečněn v rámci projektu Kyselina eikosapentaénová a dokosahexaénová jako nutriceutika modulující zánětlivou reakci a homeostázu cholesterolu Interní grantové agentury AF MENDELU. Realizace experimentu probíhala za spolupráce Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v. v. i. v Brně.

4.1.1 Charakteristika krmného pokusu – modelová zvířata, podmínky chovu, krmná směs

Experiment byl zrealizován na půdě Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v. v. i. v Brně, na adrese Hudcova 296/70, ve speciálně přizpůsobených podmínkách pro chov laboratorních zvířat v souladu se zákonem České národní rady č. 246/2002 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů zákona 162/1993 Sb., byl schválen Komisí na ochranu zvířat proti týrání Mendelovy univerzity v Brně a Ministerstvem zemědělství České Republiky.

Jako modelový organismus bylo v tomto experimentu použito Prase domácí (*Sus Srofa f. domestica*) v počtu třiceti-dvou kusů obou pohlaví (16 samců a 16 samic), hybridní plemene Large White x Landras, z SPF chovu Bioprodukt Knapovec a.s., Ústí nad Orlicí, Česká Republika. Stáří zvířat na počátku experimentu bylo osm týdnů, průměrná živá váha byla $25,5 \pm 1,15$ kg. Z technických důvodů, nebylo možné vytvořit experimentální skupinu jednotného pohlaví, věkově ani váhově homogenní. Prasata byla umístěna do experimentálních stájí, do vnitřních kotců s podlahou o rozloze 10 m^2 po čtyřech kusech do každého kotce.

Prasata byla rozdělena na dvě experimentální skupiny po šestnácti kusech, stejný počet samců i samic v každé skupině. Experimentální skupina byla krmena základní krmnou směsí s přídavkem 2,5 % rybího oleje (F), a kontrolní skupina, krmena základní krmnou směsí s přídavkem 2,5 % palmového oleje (P). P dieta, která byla použita jako kontrola, obsahovala kromě kontrolního krmiva, další základní krmnou směs buďto samostatnou nebo základní krmnou směs s přídavkem škrobu, aby byly dodrženy normy živin a dieta nebyla jen iso-kalorická, ale i iso-lipidová. Obě krmné směsi P i F celkově obsahovaly 138 g hrubého proteinu (určeno pomocí KD-310-A-1015 KjelROC Analyzer; Furulund, Švédsko), 56 g tuku (kvantifikováno jako extrakt hexane/2-

propanolu), 48g hrubé vlákniny (stanovené pomocí ANCOM²²⁰ Fiber Analyzer, Ancom Technology, Macedon, NY, USA), 758g bezdusíkatých látek výtažkových (dopočítaných, jako zbytek do 100%), (tab. 1). Obsah metabolizovatelné energie, vypočítané z obsahu živiny byl 13.6 MJ · kg⁻¹.

Tab. 1 Celkové složení krmných směsí (přepočteno na 1 kg směsi)

<i>Živiny</i>	<i>Množství (g · kg⁻¹)</i>
hrubý protein	138
tuk	56
hrubá vláknina	48
bezdusíkaté látky výtažkové	758

Základní peletizovaná kompletní krmná směs pro výkrm prasat (De Heus, Marefy, Česká republika) byla složena z pšenice, ječmene, pšeničných otrub, pšeničné krupice, tmavých liových výpalků, řepkový spirál, vinasu, uhličitanu sodného, živočišného tuku, soli, premixu vitaminů a minerálů (výrobce odmítl sdělit procentuální zastoupení jednotlivých komponent v krmivu v důsledku obchodního tajemství). Peletizované základní krmivo - směs se rozemlela a homogenizovala s přesným množstvím příslušného oleje.

Obsah kvantitativně a fyziologicky důležitých mastných kyselin v krmné směsi, F a P diety byla následující (tab. 2):

Tab. 2 Obsah MK v krmné směsi, ($g \cdot kg^{-1}$)

Počet C	Počet dvojných vazeb	Obsah MK ($g \cdot kg^{-1}$) F dieta	Obsah MK ($g \cdot kg^{-1}$) P dieta
14	0	0,92	0,96
16	0	6,79	14,78
18	0	1,30	1,73
18	1	9,56	13,97
18	2n-6	11,55	10,61
18	3n-3	0,88	0,77
20	5n-3	2,83	0,05
22	5n-3	0,58	0,04
22	6n-3	4,34	0,05

Zvířata měla po celou dobu trvání experimentu neomezený přístup k pitné vodě, byla krmena denně *ad libitum*. Denní přísun krmiva byl rozdělen na dvě dávky, které byly zkrmovány dvakrát denně (ráno v 7.00 a odpoledne v 14.00 hodin). Čistá spotřeba krmiva byla měřena dvakrát denně odečtením zbytků. Vzhledem k přístupu ke krmivu *ad libitum*, nebyly zjištěny mezi zvířaty významné rozdíly ve spotřebě krmiva. Kontrolní vážení - průběžně byla zvířata vážena v týdenních intervalech, výkrm trval po dobu 70 dní.

4.1.2 Chemiluminiscenční test

Test stimulované chemiluminiscence (CL) byl použit pro vyhodnocení respiračního vzplanutí v leukocytech, izolovaných z krve deseti náhodně vybraných prasat z každé skupiny. Izolace leukocytů byla provedena použitím hypotonické lyzační metody, celá krev byla smíchána s vodou (USP WFI, Lonza, Kouřim, Česká Republika), v poměru 1:12. Po 30 sekundách lýze, byla tonicita zvýšena $10 \cdot DPBS$ (Dulbecco, fosfátem pufrovaný fyziologický roztok, Lonza). Buňky byly dvakrát promyty ve vyváženém solném roztoku HBBS (Hankův vyvážený solný roztok, Lonza) a spočítány na automatickém analyzátoru Mindray BC-2800 Vet (Mindray, Čína), podle instrukcí výrobce. Leukocyty byly nasazeny do HBBS o koncentraci 10^6 buněk na jamku. Pro amplifikaci CL byl přidán luminol-derivát L-012 (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Německo), rozředěný v HBSS na konečnou koncentraci $10 \text{ nmol} \cdot l^{-1}$.

Chemiluminiscence byla stimulována buď zymosanem o konečné koncentraci $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika), nebo forbol myristát acetátem (PMA) o koncentraci $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Sigma-Aldrich). Chemiluminiscence byla měřena v kinetickém módu při teplotě 37°C po dobu 2 hodin za použití multidetekčního mikroplata Synergy H1 Reader (BioTek, Winooski, VT, USA). Výsledky měření byly vyjádřeny jako integrály intenzity chemiluminiscence.

4.1.3 Ošetření lipopolysacharidem (LPS)

Poslední den výkrmu (tj. 70. den výkrmu), byla skupina prasat krmená F a P dietou, v daném pořadí, náhodně rozdělena (nezávisle na výběru, pokud jde o stanovení testu chemiluminiscence, viz výše) do dvou skupin po osmi zvířatech (osm F a osm P prasat). Byl jim aplikován intravenózně lipopolysacharid *E. Coli* (LPS) v množství $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ živé váhy (W) do žíly za ušním boltcem (*vena auricularis*). Tři hodiny po aplikaci LPS, byla všem prasatům podána intramuskulární anestézie. Aplikaci TKX směsi intramuskulárně $12,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ketaminu (Vetoquinol, Lure, Francie) + $12,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ xylazinu (Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika) + $12,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ tiletaminu (Virbac, Carros, Francie) + $12,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ zolazepamu (Virbac, Carros, Francie) v celkovém objemu $0,2 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ W, a usmrcena vykrvácením.

4.1.4 Odběr vzorků tkání jater, tuku a krve

Vzorky krve byly odebírány z aorty do zkumavek potažených heparinem, následně byly centrifugovány při rychlosti 2000 g po dobu 10 minut při teplotě 4°C za účelem získání plazmy. Dále byly odebrány vzorky pánevního (viscerálního) tuku o hmotnosti 100 g a vzorky jaterní tkáně o hmotnosti 100 g, které byly zlyofilizovány a uskladněny při teplotě -20°C pro následné analýzy mastných kyselin. Bezprostředně po izolaci dalších vzorků tkání jater o hmotnosti 50 g a pánevního tuku o hmotnosti 50 g byla provedena izolace celkové RNA.

4.1.5 Detekce NF- κ B, PPAR γ

Vzorky:

- 4 g jater
- 4 g viscerálního tuku

Reagencie:

- pufr A
- inhibitory proteáz (Sigma-Aldrich, USA)
- 1 % Triton-100
- pufr B
- 4-20% Mini-Protean TGX gelu (Bio-Rad, USA)
- redukční pufr
- tris-glycinový pufr
- pufr pro blotting
- 1 % BSA v PBS
- protilátka králičí anti-adiponektin (ThermoFisher Scientific, USA)
- králičí anti- β -aktin, králičí anti-PPAR γ , králičí anti-NF- κ B protilátky (SantaCruz, Biotechnology, USA)
- PBS s 0,1% BSA
- PBS Tween-20 (PBS-T)
- protilátka sekundární kozí anti-králičí
- křenová peroxidáza (Sigma-Aldrich)
- chromogenní substrát 3- aminoethyl-9-karbazolu v 0,5 M acetátovém pufru
- voda

Vybavení:

- homogenizátor (IKA® Ultra-Turrax T8, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- centrifuga (Hettich Universal 32R, Hettich, Německo)
- SDS-PAGE Mini Protean Tetra aparát
- zdroj napětí (Power Basic, Bio-Rad, USA)
- PVDF membrána (Bio-Rad, USA)
- Biometra Fasblot aparát (Biometra, Německo)
- program ImageJ™ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

Přibližně 4g vzorku jater a 4g viscerálního tuku v uvedeném pořadí byly smíchány s pufrům A (0,25 M sacharóza, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 3 mM MgCl₂, 1 ml na 1 g jater) a koktejl inhibitorů proteáz 2 mM AEBSF, 0,3 μ M aprotinin, 130 μ M bestatin, 1 mM EDTA, 14 μ M E-64, 1 μ M leupeptin, 0,1 ml na 1 g jater. Směs byla homogenizována po dobu 5 minut a následně centrifugována po dobu 5 minut při rychlosti 300 · g při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla

resuspendována ve 4 ml pufru A, 0,4 ml inhibitorů proteáz a jednoprocenním Triton-100 (10 μ l na 1 ml pufru A), směs byla homogenizována po dobu 5 minut a následně centrifugována po dobu 5 minut při rychlosti 300 \cdot g při teplotě 4°C. Supernatant byl uložen při teplotě -20°C pro stanovení cytosolického obsahu PPAR γ a adiponektinu pomocí metody Western-Blott, srovnání a ověření imunoblotem s β -aktinem.

Pro detekci NF- κ B, byla peleta resuspendována ve 2 ml pufru B (20 mM HEPES (pH 7,4), 0,1 M KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol) a 0,2 ml inhibitorů proteáz. Směs byla centrifugována při 100000 \cdot g po dobu 1 hodiny při teplotě 4°C. Výsledný supernatant obsahoval jaderný protein, který byl použit pro analýzu NF- κ B pomocí metody Western-Blott. Před analýzou Western-Blottem byl změřen obsah proteinu ve vzorcích biuretovou metodou a následně vzorky zředěny odpovídajícím způsobem tak, aby všechny proteiny zaplnily jamky v gelu ve stejném množství 100 μ g. Rovnoměrnost zatížení proteinů byla potvrzena barvením Coommasie modří a detekována s β -aktinem.

SDS-PAGE byla provedena za použití Mini Protean Tetra aparátu na 4-20% Mini-Protean TGX gelu. Před analýzou byly vzorky smíchány s redukčním pufrem (5 % β -merkapt ethanol) v poměru 2:1. Následně byly vzorky povařeny po dobu 2 minut, poté naneseny na gel. Elektroforéza probíhala při 150 V napětí po dobu jedné hodiny v tris-glycinovém pufru (0,025 M Tris-báze, 0,16 M glycin, 3,5 mM SDS, pH 8,3). Separované proteiny byly přeneseny na PVDF membránu v Biometra Fasblot aparátu pod konstantním napětím 0,9 mA na cm² membrány. PVDF membrána byla aktivována namáčením v ethanolu po dobu 30 sekund před začátkem a vyvážena v roztoku pufru pro blotting (12,5 mM Tris-báze, 75 mM glycin, 15 % methanol) po dobu 5 minut. Po ukončení přenosu, byla membrána zafixována v roztoku 1 % BSA v PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM NaH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) po dobu 30 minut. Inkubace s protilátkami: králičí anti-adiponektin, králičí anti- β -aktin, králičí anti-PPAR γ , králičí anti-NF- κ B protilátky, ředění 1: 200 PBS s 0,1 % BSA po dobu 2 hodin při teplotě 20°C. Po třech promytích roztokem PBS, které obsahovalo 0,05 % (v/v) Tween-20 (PBS-T) po dobu 5 minut byla membrána inkubována se sekundární koží anti-králičí protilátkou značenou křenovou peroxidázou, naředěnou 1: 2000 po dobu 1 hodiny při 20°C. Membrána byla třikrát promývána po dobu 5 minut roztokem PBS-T a inkubována v chromogenním substrátu 3- aminoethyl-9-karbazolu v 0,5 M acetátovém pufru (0,4 mg na ml⁻¹ s 0,1 % H₂O₂, pH 5,5). Reakce byla zastavena opláchnutím membrány vodou, následně byla membrána vysušena a naskenovány relativní hladiny

proteinů, které byly kvantifikovány denzitometrickým skenováním pomocí programu ImageJ™. Hodnota hustoty jednotlivých proužků byla vyjádřena v libovolných jednotkách jako poměr optické hustoty.

4.1.6 Stanovení plazmatických cytokinů a adiponektinu v plazmě

Cytokiny IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 a koncentrace TNF- α v prasečí plazmě byla měřena pomocí metody multiplexové analýzy pomocí magnetických kuliček, konkrétně kitu Milliplex^R MAP prasečí cytokiny / chemokiny panel s magnetickými kuličkami (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) v souladu s doporučením producenta.

Stanovení celkového plazmatického adiponektinu bylo provedeno enzymatickou imunologickou analýzou ELISA, prasečí Adiponektin ELISA (BioVendor, Brno, Česká Republika), podle instrukcí výrobce.

4.1.7 Analýza mastných kyselin

Analýza MK ve vzorcích jater, ve viscerální tukové tkáni a ve vzorcích krmiva byla stanovena po celkové extrakci lipidů směsí hexanu s 2- propanolem, podle postupu popsaného v předchozí studii (Komprda *et al.*, 2016).

4.1.8 Statistické hodnocení

Rozdíly mezi dietárními intervencemi byly hodnoceny jedno-faktorovou analýzou rozptylu (ANOVA), včetně *post-hoc* Tukeyova testu, resp. t-testem (sady s normálním rozložením). U všech hodnocení byla použita STATISTICA 12 balíček (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Průměrná spotřeba krmiva

Průměrný denní příjem krmiva u prasat krmených F a P dietou byl podobný, tj. rozdílné složení krmných směsí nemělo na příjem krmiva průkazný vliv ($P > 0,05$; tab. 3).

Tab. 3 Průměrná spotřeba krmiva ($g \cdot den^{-1}$), ($g \cdot kg W^{-1} \cdot den^{-1}$)

Průměrný příjem krmiva	F dieta	P dieta
$g \cdot den^{-1}$	880 ^a	890 ^a
$g \cdot kgW^{-1} \cdot den^{-1}$	10,5 ^a	10,6 ^a

Hodnoty v řádcích označené stejnými písmeny (a) se průkazně neliší ($P > 0,05$). F dieta obsahovala základní krmnou směs s přidavkem 2,5 % rybího oleje, P dieta obsahovala základní krmnou směs s přidavkem 2,5 % palmového oleje.

Dle studií autorů Howe *et al.* (2014) bylo předpokládáno, že konzumace EPA/ DHA může přispět ke snížení hmotnosti. Nicméně omezené pokusy studia obezity na zvířecích modelech doposud neprokázaly vliv EPA/ DHA na příjem krmiva. V tomto experimentu byl průměrný denní příjem krmiva u obou testovaných skupin podobný.

5.2 Průměrný denní přírůstek, živá hmotnost prasat

Hodnoty průměrného denního přírůstku a živé hmotnosti prasat krmených dietou F i P byly podobné, nebyl zjištěn žádný signifikantní vliv typu dietního oleje na některý z výše uvedených znaků ($P > 0,05$; tab. 4).

Tab. 4 Průměrný denní přírůstek, živá hmotnost prasat, příjem EPA a DHA

	<i>Průměr. denní přírůstek (kg · den⁻¹)</i>	<i>Živá hmotnost prasat (kg)</i>	<i>Příjem EPA + DHA (mg · kg W⁻¹ · den⁻¹)</i>
Dieta F	0,85 ± 0,05 ^a	83,64 ± 1,82 ^a	30 + 46 · 0,5 ^a
Dieta P	0,86 ± 0,04 ^a	84,06 ± 3,35 ^a	30 + 46 · 0,5 ^a

Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny (a) se průkazně neliší ($P > 0,05$). F dieta obsahovala základní krmnou směs s přidavkem 2,5 % rybího oleje, P dieta obsahovala základní krmnou směs s přidavkem 2,5 % palmového oleje.

V tomto experimentu nebyl prokázán vliv EPA/ DHA na denní přírůstek hmotnosti u prasat krmených palmovým nebo rybím olejem a naše výsledky souhlasí s výsledky autorů Chen *et al.* (2012), kteří uvádějí, že olej obsahující DHA významně neovlivnil přírůstek hmotnosti u odstavených selat ve srovnání s doplňkem hovězího loje. Rybí olej a hovězí lůj vykazovaly stejné výsledky průměrného denního přírůstku hmotnosti u potkanů v předchozím pokusu, na který tento experiment navazuje (Komprda *et al.*, 2016).

5.3 Test stimulované chemiluminiscence

Před ošetřením LPS, byla kvantifikována schopnost leukocytů produkovat reaktivní formy kyslíku. Při stimulaci chemiluminiscence zymosanem, nebyl prokázán žádný významný rozdíl mezi leukocyty prasat krmených F nebo P dietou. Integrál intenzity chemiluminiscence byl u F diety $0,35 \cdot 10^8$ a u P diety $0,15 \cdot 10^8$ ($P > 0,08$). Nicméně po stimulaci forbol-myristát acetátem (PMA), se objevila vyšší náchylnost k respiračnímu vzplanutí v leukocytech u F prasat krmených rybím olejem, než u P prasat krmených palmovým olejem. Integrál intenzity chemiluminiscence u prasat s F a P dietou byl $4,4 \pm 0,59 \cdot 10^8$, resp. $1,4 \pm 0,29 \cdot 10^8$ ($P < 0,05$; $n = 10$), (tab. 5).

Tab. 5 Integrál intenzity chemiluminiscence po stimulaci zymosanem a PMA

	<i>Zymosan</i>	<i>PMA</i>
Dieta F	$0,35 \cdot 10^8$ ^a	$4,4 \pm 0,59 \cdot 10^8$ ^b
Dieta P	$0,15 \cdot 10^8$ ^a	$1,4 \pm 0,29 \cdot 10^8$ ^a

Hodnoty ve sloupcích označené různými písmeny (a, b) ve sloupcích se průkazně liší ($P < 0,05$; $n = 10$). F dieta obsahovala základní krmnou směs s přidavkem 2,5 % rybiho oleje, P dieta obsahovala základní krmnou směs s přidavkem 2,5 % palmového oleje. Zymosan - aplikován pro indukci zánětu, PMA - specifický aktivátor proteinkinázy C a NF- κ B.

Vyšší náchylnost u leukocytů prasat krmených rybím olejem (před stimulací LPS) k produkci reaktivních forem kyslíku v tomto experimentu souhlasí s nálezem autorů Johansson *et al.* (2015), kteří uvádějí, že DHA měla vliv na přechodné zvýšení hladiny buněčných reaktivních forem kyslíku. Podle studie autorů Zhang *et al.* (2015), PUFA n-3 indikovaly tvorbu reaktivních forem kyslíku v buňce. Podobné výsledky interpretují i autoři Fernandez-Iglesias *et al.* (2013), kteří uvádí, že v buňkách obohacených o DHA došlo ke zhoršení produkce reaktivních forem kyslíku a snížení životaschopnosti buněk. Podobně jako ve studii autorů Paschoal *et al.* (2013) EPA i DHA zvýšila produkci H_2O_2 ve stimulovaných i nestimulovaných potkaních neutrofilech.

Na druhé straně EPA a DHA snížily aortální produkci reaktivních forem kyslíku a zánětlivou odpověď při ateroskleróze indukované vysokým obsahem tuku, v experimentu výzkumné skupiny autorů Liu *et al.* (2016), kteří ve své studii konstatují, že účinky PUFA n-3 na kardiovaskulární onemocnění jsou stále kontroverzní. Lze tedy doporučit další zkoumání v oblasti působení PUFA n-3 při onemocněních oběhového systému.

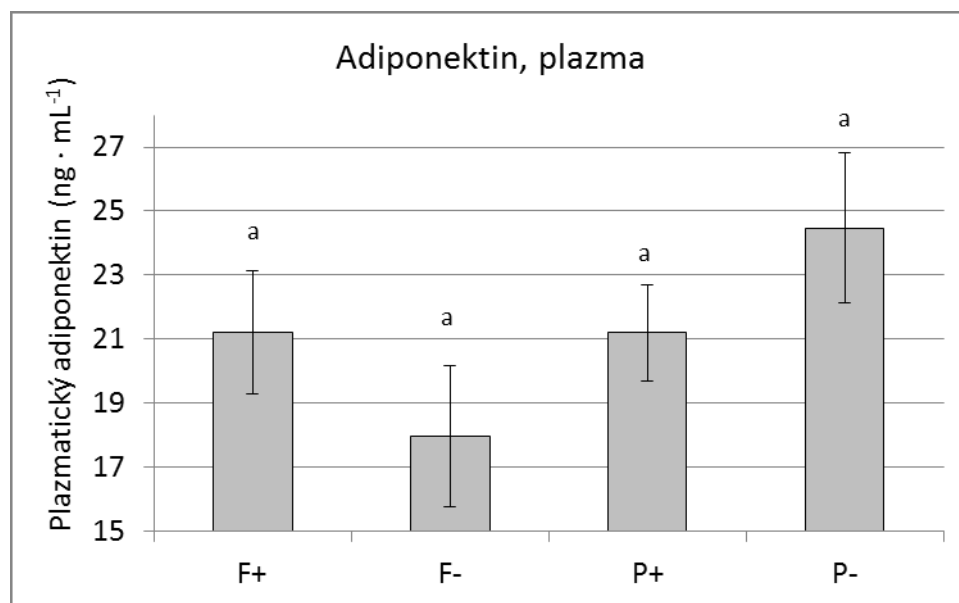
5.4 Adiponektin, PPAR γ

Vzhledem k velké variabilitě v rámci souboru, nebyly stanoveny žádné významné výsledky týkající se množství adiponektinu a proteinů PPAR γ v tukové tkáni ($P > 0,05$).

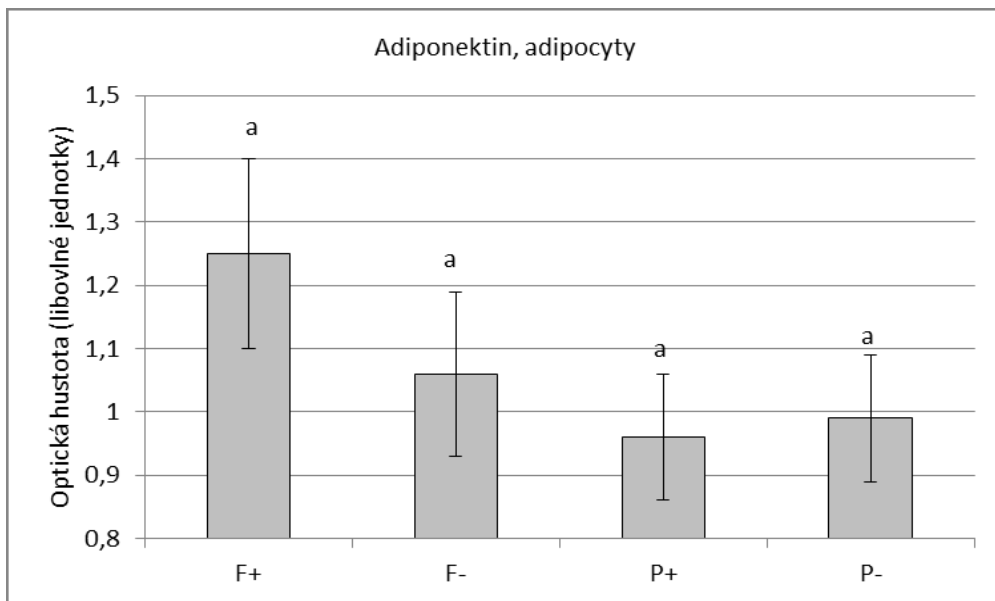
Lze však uvést některé zajímavé tendence, a to, že prasata krmená F dietou ošetřená LPS (ve srovnání s LPS neošetřenými prasaty) měli tendenci ke zvýšení plazmatické hladiny adiponektinu o 18 % ($p = 0,12$; obr. 14), které bylo pravděpodobně odrazem tendence k vyšším hodnotám v adipocytech o 18 % u F prasat ošetřených LPS ve

srovnání s intaktními F protějšky ($p = 0,12$, obr. 15). Nicméně plazmatická hladina adiponektinu byla stejná u prasat ošetřených LPS u F i P diety ($21,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $P > 0,05$; obr. 14).

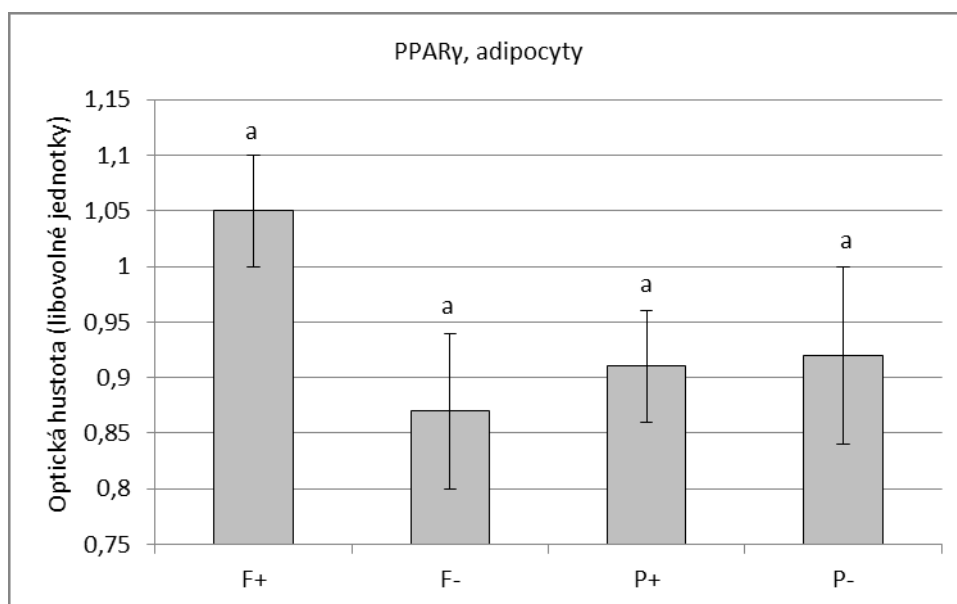
Koncentrace jaderných receptorů PPAR γ u adipocytů F prasat po podání LPS měla tendenci se zvýšit o 21 % ve srovnání s P kontrolou ošetřenou LPS ($P = 0,11$; obr. 16).



Obr. 14 Plazmatická koncentrace adiponektinu; Koncentrace adiponektinu v plazmě prasat krměných sedm týdnů krmivem s přidavkem 2,5 % rybího oleje (F) a 2,5 % palmového oleje (P), v daném pořadí, a následně buď stimulovány LPS (F +, P +), nebo ponechána bez aplikace LPS, tedy intaktní (F -, P -). Analýza pomocí metody ELISA; průměry označené (a) se průkazně neliší ($P > 0,05$; průměr \pm střední chyba průměru, $n = 8$; zjištěno pomocí jedno-faktorové analýzy rozptylu s *post-hoc* Tukeyovým testem)



Obr. 15 *Koncentrace adiponektinu v tukové tkáni; Denzitometrická kvantifikace množství adiponektinu v tukové tkáni prasat kmených sedm týdnů krmivem s přídatkem 2,5 % rybího oleje (F) a 2,5 % palmového oleje (P), v daném pořadí, a následně buď stimulovány LPS (F +, P +), nebo ponechána bez aplikace LPS, tedy intaktní (F -, P -). Analýza pomocí metody Western-blott; průměry označené (a) se průkazně neliší ($P > 0,05$; průměr \pm střední chyba průměru, $n = 8$; zjištěno pomocí jedno-faktorové analýzy rozptylu s *post-hoc* Tukeyovým testem)*



Obr. 16 Koncentrace PPAR γ v tukové tkáni; Denzitometrická kvantifikace množství receptorů aktivovaných proliferátory peroxizomů v tukové tkáni prasat krmených sedm týdnů krmivem s přidavkem 2,5 % rybího oleje (F), resp. 2,5 % palmového oleje (P), v daném pořadí, a následně buď stimulovány LPS (F +, P +), nebo ponechána bez aplikace LPS, tedy intaktní (F -, P -). Analýza pomocí metody Western-blokt; průměry označené (a) se průkazně neliší ($P > 0,05$; průměr \pm střední chyba průměru, $n = 8$; zjištěno pomocí jedno-faktorové analýzy rozptylu s *post-hoc* Tukeyovým testem)

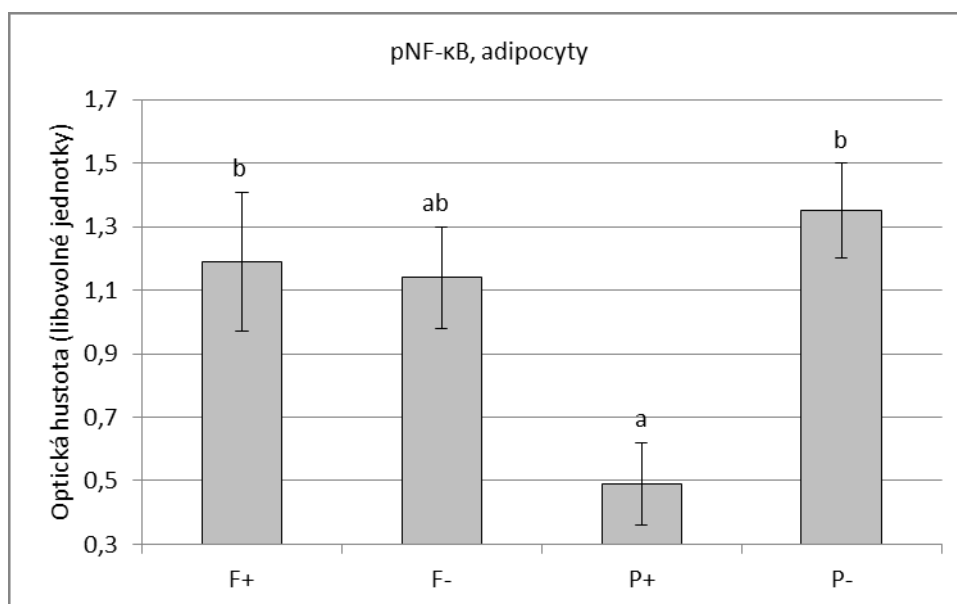
V naší studii jsme předpokládali naměření vyšších hodnot adiponektinu v tukové tkáni prasat, náš experiment tento předpoklad potvrdil, ačkoliv výsledky nebyly statisticky průkazné. Dalším předpokladem bylo, působení ligandů EPA a DHA na zvýšení hladiny protizánětlivých jaderných receptorů PPAR. U rostoucích prasat může lipopolysacharid (LPS) ve viscerální tukové tkáni způsobit akutní zánět (Guo *et al.*, 2015). Podle studií autorů Puglisi *et al.* (2011) adiponektin, hormon tukové tkáně, který se v organismu podílí na regulaci homeostázy energie, hraje roli při onemocněních oběhového systému nebo *diabetu mellitu* II. typu, je považován za významnou protizánětlivou látku. Adiponektin se v adipocytech udržuje v lumen endoplazmatického retikula pomocí vazby na protein ERp44. Transkripční aktivitu tohoto proteinu ERp44 řídí receptory jaderné membrány PPAR γ , které fungují jako jeho základní regulační faktory. ERp44 reguluje sekreci adiponektinu (Long *et al.*, 2010). Pravděpodobně v důsledku skutečnosti, že EPA a DHA jsou přirozené ligandy PPAR γ , bylo množství adiponektinu ve viscerální tukové tkáni F prasat stimulovaných LPS až 130 % oproti P prasatům stimulovaných LPS v našem pokusu (obr. 15). Nicméně rozdíl nebyl statisticky

významný ($P > 0,05$), pravděpodobně v důsledku velké variability mezi jednotlivými prasaty. Plazmatický adiponektin byl stejný ($21,1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$; $P = 0,98$) u F i P prasat stimulovaných LPS (obr. 14).

Další možné vysvětlení méně významných výsledků, pokud jde o adiponektin, mohla být i relativně nízká dietární dávka EPA a DHA ($76 \text{ mg} \cdot \text{KGW}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$) u F prasat v tomto experimentu. Krmivo s přidavkem rybího oleje s vysokým obsahem tuku zvýšilo hladinu adiponektinu u myši v experimentu autorů Sundaram *et al.* (2016). Autoři však dospěli k závěru, že dietární úroveň PUFA n-3 nehráli roli při testování produkce adiponektinu. Ve studii autorů Duan *et al.* (2014) dospěli k závěru, že byla výrazně snížena hladina adiponektin u prasat ve fázi dokončeného růstu, krmených dietou s odlišným poměrem PUFA n-6/n-3, i když byla použita dieta s optimálním poměrem 1/1. Autorům Gammelmark *et al.* (2012) se podařilo zjistit, malé, ačkoliv významné zvýšení hladiny sérového adiponektinu, ale žádný celkový protizánětlivý účinek ve dvojité zaslepeném, placebem kontrolovaném výzkumu na lidských subjektech trpících nadváhou, přijímajících šest týdnů $1,1 \text{ g}$ PUFA n-3 za den. Autoři Wu *et al.* (2013) dospěli k závěru, založeném na meta-analýzách randomizovaných, placebem kontrolovaných klinických studiích, že rybí olej pouze mírně zvýšil hladinu plazmatického adiponektinu.

5.5 Stanovení hladiny NF- κ B

U skupiny F prasat, která byla stimulována LPS, došlo ke zvýšení množství aktivní frakce jaderného faktoru kappa B (NF- κ B) oproti skupině P prasat, ošetřených LPS ($P < 0,05$; obr. 17). Nicméně mezi F prasaty stimulovanými LPS a intaktními nebyl zaznamenán žádný průkazný rozdíl ($P > 0,05$). Na druhé straně stimulace LPS snížila množství aktivní frakce NF- κ B v tukové tkáni P prasat krmených palmovým olejem ($P < 0,05$).



Obr. 17 Koncentrace *pNF-κB* v tukové tkáni; Denzitometrická kvantifikace množství fosforylovaného jaderného faktoru kappa B v tukové tkáni prasat krměných sedm týdnů krmivem s přidávkem 2,5 % rybího oleje (F) a 2,5 % palmového oleje (P), v daném pořadí, a následně buď stimulovány LPS (F +, P +), nebo ponechána bez aplikace LPS, tedy intaktní (F -, P -). Analýza pomocí metody Western-blot; průměry označené různými písmeny (a, b) se průkazně liší ($P < 0,05$; průměr \pm střední chyba průměru, $n = 8$; zjištěno pomocí jedno-faktorové analýzy rozptylu s *post-hoc* Tukeyovým testem)

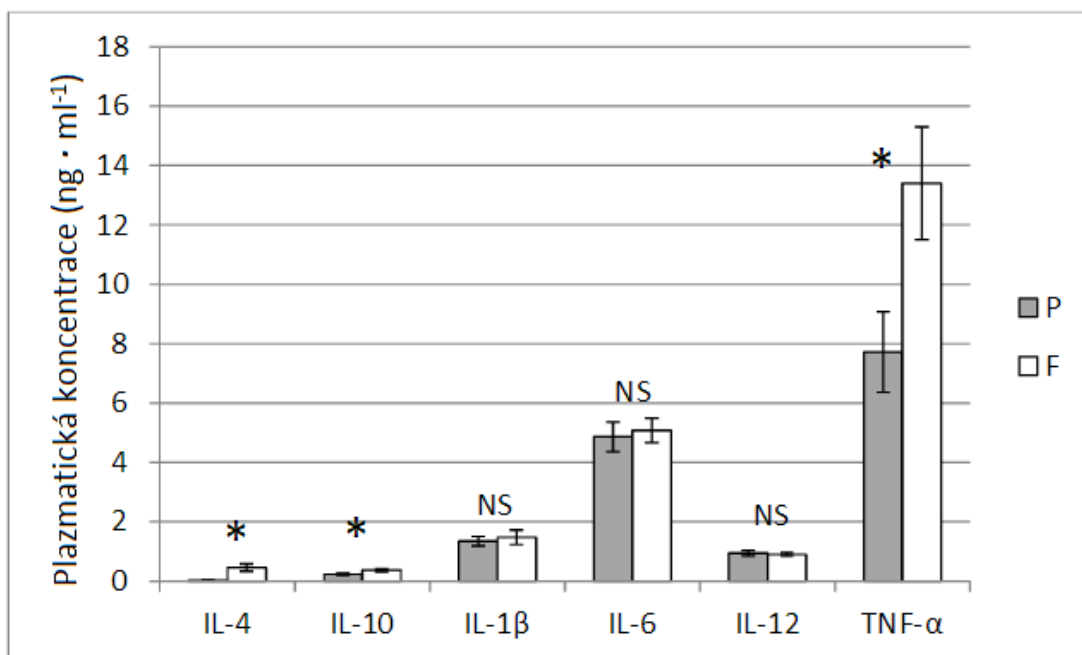
Naším cílem bylo potvrdit vliv účinných složek rybího tuku na potlačení exprese proteinu NF-κB v tukové tkáni prasat. Přepokládali jsme, že EPA a DHA přes signální dráhu PPAR γ inhibuje zánětlivý protein NF-κB. Zvýšení ($P < 0,05$) množství aktivní fosforylované frakce proteinu NF-κB v tukové tkáni F prasat po stimulaci LPS, ve srovnání s kontrolou, zjištěné v tomto experimentu, je těžko vysvětlitelné, protože výsledek je v rozporu s testovanou hypotézou. Dle autorů Oliver *et al.* (2012) ve studii *in vitro*, potvrdily pozitivní účinky EPA a DHA, které snížily aktivaci transkripčního faktoru NF-κB v makrofázích stimulovaných LPS. Rovněž experiment *in vivo* autorů Liu *et al.* (2012), kde rybí olej snížil expresi proteinů NF-κB ve střevech odstavených selat stimulovaných LPS. Studie autorů Bashir *et al.* (2016) uvádí snížení hladiny proteinu NF-κB při navyšování množství rybího tuku podávaného obézním myším resistantních k inzulinu.

Na druhé straně vyšší množství proteinu NF-κB v tukové tkáni prasat stimulovaných LPS (F +) ve srovnání s P kontrolou (P +) v našem experimentu (P

<0,05; obr. 17), odpovídá zvýšené expresi genů kódující prozánětlivé cytokiny IL-1 a IL-6 v této tkáni, i zvýšení plazmatické koncentrace TNF- α (P <0,05; obr. 18). V rozporu s našimi výsledky, v experimentu autorů Upadhaya *et al.* (2015) suplementace PUFA n-3 snížila sérový TNF- α u prasat stimulovaných LPS. Nejednoznačné vztahy mezi množstvím proteinu NF- κ B v adipocytech a naměřených zvýšených plazmatických hladin pro i protizánětlivých cytokinů, potvrzuje závěry autorů De Boer *et al.* (2014), kteří ve své studii konstatují, že transkripčně aktivní podjednotka NF- κ B nemusí být spolehlivým koncovým ukazatelem míry zánětlivého stavu buněk.

5.6 Plazmatická koncentrace cytokinů

Tendenci rybího oleje stimulovat geny kódující jak protizánětlivé, tak prozánětlivé cytokiny v játrech a v tukové tkáni (bylo předmětem jiné diplomové práce), lze potvrdit i u plazmatických koncentrací cytokinů (obr. 18). Vyšší koncentrace dvou protizánětlivých cytokinů – interleukinu IL-4 a IL-10 a rovněž i prozánětlivého cytokinu TNF- α v plazmě prasat krmených dietou s rybím olejem (P <0,05).



Obr. 18 Plazmatická koncentrace vybraných cytokinů – interleukinů IL-4, IL-10, IL-1β, IL-6, IL-12 a TNF-α (*tumor necrosis faktor α*) v plasmě prasat krmených po dobu sedmi týdnů krmivem s přidavkem 2,5 % rybího oleje (F) a 2,5 % palmového oleje (P) a následně stimulovaných LPS; průměr ± střední chyba průměru, n = 8; NS - nejsou významné; * P< 0,05; zjištěno t-testem)

V našem experimentu jsme předpokládali, že po stimulaci LPS, dojde ke zvýšení hladiny protizánětlivých cytokinů u F prasat. Po stimulaci LPS u F prasat došlo k výraznějšímu navýšení hladiny prozánětlivého cytokinu TNF-α než u P prasat, což odporuje testované hypotéze, potvrzující protizánětlivý účinek EPA a DHA. Odlišné výsledky interpretují, autoři Upadhaya *et al.* (2015), kteří uvádějí, že suplementace PUFA n-3 snížila sérový TNF-α u prasat ošetřených LPS. V experimentu autorů Vaisman *et al.* (2005) byly podobně jako v našem experimentu, ve srovnání s kontrolní skupinou, naměřeny zvýšené hladiny nejen protizánětlivých (IL-1β, IL-10), ale i prozánětlivých cytokinů (TNF-α, IL-6), a to v periferních krevních mononukleárních buňkách stimulovaných LPS, poté co byly odebrány dětem, kterým byly podávány PUFA n-3 (300 mg / den po dobu 12 týdnů). Ve studii autorů Petursdottir a Hardordottir (2007) bylo podobně zjištěno, že dietární rybí olej zvýšil hladinu TNF-α po stimulaci LPS a sekreci IL-10 myšimi splenocyty. EPA i DHA zvýšily uvolňování TNF-α v potkaních nestimulovaných neutrofilech *in vitro*. Dle autorů Paschoal *et al.* (2013)

v přítomnosti LPS, samostatná DHA zvýšila protizánětlivý interleukin IL-1 β . Naše poznatky jsou v souladu s výsledky autorů Liu *et al.* (2012), že ligandem indukovaná aktivace PPAR γ zvýšila produkci prozánětlivého cytokinu u odstavených prasat ošetřených LPS. Na druhé straně autoři Vigerust *et al.* (2013) uvádí, že neexistuje žádný podstatný vliv rybího tuku na produkci prozánětlivých cytokinů u myší. Dle autorů Hall *et al.* (2012) EPA a DHA po vyvolání zánětu u potkanů neinhibovala nárůst prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-1 a TNF- α .

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit pozitivní vliv polynenasycených mastných kyselin n-3 na expresi proteinů, které modulují či potlačují zánětlivou reakci v organismu neproliferujícího druhu – prasete. V teoretické části jsou shrnuty základní poznatky o lipidech a mastných kyselinách a jejich funkcích v savčím organismu. Podrobněji je tato práce věnována nenasyceným mastným kyselinám a jejich biologickým účinkům ve vztahu k modulaci exprese proteinů ovlivňující zánětlivou reakci. Blíže jsem popsala průběh zánětu i jednotlivé jaderné regulační mechanismy, které ho ovlivňují. Dále zde byly uvedeny molekulárně-biologické metody, které byly aplikované v tomto experimentu pro kvantifikaci míry exprese proteinů v jednotlivých tkáních. V praktické části jsou charakterizovány podmínky experimentu, kvantifikovány míry exprese proteinů PPAR γ a NF- κ B v cílových tkáních, vyhodnocení naměřených dat a diskuze.

Tato diplomová práce byla součástí projektu grantové agentury AF MENDELU s názvem: Kyselina eikosapentaénová a dokosahexaénová jako nutraceutika modulující zánětlivou reakci a homeostázu cholesterolu, jehož cílem bylo ověřit pozitivní vliv EPA a DHA na modulaci exprese proteinů PPAR a NF- κ B, ovlivňující průběh zánětlivé reakce.

Modelovým organismem v tomto experimentu bylo prase domácí (*Sus Scrofa f. domestica*), které patří podobně jako člověk k druhům neproliferujícím (ve smyslu signální dráhy PPAR). Tento experiment měl za úkol zpřesnit výsledky z předchozího pokusu na laboratorních potkanech (proliferující druh).

Testovaná skupina prasat byla krmena základní krmnou směsí s přídatkem 2,5 % rybího oleje a kontrolní skupina, která byla krmena krmnou směsí s přídatkem 2,5 % palmového oleje. Pro vyvolání zánětlivé reakce bylo použito ošetření lipopolysacharidem *E. Coli* (LPS), který byl aplikován na konci výkrmu (tj. 70. den) polovině, tj. 8 testovaným zvířatům z každé skupiny. Cílem pokusu bylo zjistit, jak ve stravě běžně dostupné množství EPA a DHA moduluje průběh zánětu. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že příjem PUFA n-3 neměl prokazatelný vliv na denní přírůstek hmotnosti ani živou hmotnost prasat ($P > 0,05$). Schopnost leukocytů produkovat reaktivní formy kyslíku byla při stimulaci chemiluminiscence forbol-myristát acetátem (PMA) prokazatelně vyšší u F diety ($P < 0,05$). Koncentrace jaderných receptorů PPAR γ u adipocytů F prasat po podání LPS, měla tendenci se zvýšit ($P > 0,05$) o 21 % ve

srovnání s P kontrolou stimulovanou LPS. Podobná byla tendence ke zvýšení koncentrace adiponektinu v plazmě u F diety po aplikaci LPS, které byly odrazem vyšších hodnot adiponektinu v adipocytech, avšak hodnoty v plazmě P prasat po stimulaci LPS byly podobné ($P > 0,05$). Plazmatický adiponektin nabýval stejných hodnot $21,1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ u experimentální i kontrolní skupiny ($P > 0,05$). Zvýšení ($P < 0,05$) množství aktivní fosforylované frakce proteinu NF- κ B v tukové tkáni F prasat po stimulaci LPS ve srovnání s kontrolou. Zvýšení ($P < 0,05$) plazmatické koncentrace protizánětlivých interleukinů IL-4 a IL-10 i protizánětlivého TNF- α u F prasat po aplikaci LPS.

Závěr, týkající se testované hypotézy v tomto experimentu je nejednoznačný. Pozitivní výsledky ve smyslu utlumení akutního zánětu jsou průkazné u F prasat stimulovaných LPS, u kterých došlo ke zvýšení plazmatické koncentrace protizánětlivých interleukinů IL-4 a IL-10. Zvýšené množství proteinu NF- κ B ve viscerální tukové tkáni, resp. zvýšená hladina prozánětlivého mediátoru TNF- α v plazmě F prasat krmených rybím olejem, jsou v rozporu s testovanou hypotézou. Proto nelze tímto experimentem spolehlivě potvrdit testovanou hypotézu, která by prokázala pozitivní vliv rybiho oleje na potlačení zánětlivé reakce. Bylo by proto vhodné experiment opakovat na souboru více uniformních zvířat a/nebo aplikovat vyšší dietární dávky EPA a DHA tak, aby se docílilo prokazatelných výsledků.

LITERÁRNÍ ZDROJE

ALBERTS B., BRAY D., HOPKIN K., JONSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., 2008: *Molecular Biology of the Cell*, 5. vydání, Garland Science, New York, 404s, ISBN 0-8153-4072-9

ALBUQUERQUE A., NEVES A. J., REDONDEIRO M., LARANJO M., FÉLIX M. R., FREITAS A., TIRAPICOS L. J., MARTINS M. J., 2016: Long term betaine supplementation regulates genes involved in lipid and cholesterol metabolism of twomuscles from an obese pig breed, An article, *Meat science* 124 (2017), 25-33

BAKER R. G., HEYDEN M. S., GOSH S., 2011: NF- κ B, inflammation, and matabolic diseases, *Cell Metabolism*, 13(1): 11-22

BALAKUMAR P., ROSE M., GANTI S. S., KRISHAN P., SINGH M., 2007: "PPAR duální agonisté: otevírá se jimí Pandořina skříňka?", *Pharmacol Res*, 56: 91-8

BASHIR S., SHARMA Y., ELAHI A., KHAN F., 2016: Amelioration of obesity-associated inflammation and insulin resistance in c57bl/6 mice via macrophage polarization by fish oil supplementation, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 33: 82-90

BROWN M. S., GOLSTEIN J. L., 1997: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell*, 89 (3): 331-40

CALDER P. C., 2006: Polyunsaturated fatty acids and inflammation, *Biochemical Society Transaction*, 33(2): 423-427, ISSN 09523278

CALDER P. C., 2012: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3): 645-662, ISSN 03065251

CORMIER H., RUDKOWSKA I., LEMIEUX S., COUTURE P., VOHL M. C., 2016: Expression and sequence variants of inflammatory genes; Effects in plasma inflammation biomarkers following a 6- week supplementation with fish oil, *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 375

- DAS U., 2006: Essential fatty acids- A review, *Current Pharmaceuticals Biotechnology*, 7: 467-482
- DE BOER A. A., MONK J. M., ROBINSON L. E., 2014: Docosahexaenoic acid decreases pro-inflammatory mediators in an *in vitro* murine adipocyte macrophage co-culture model, *PLoS ONE* 9: e85037
- DEJARDIN E., 2006: The alternative NF- kappaB pathway from bio-chemistry to bio-logy: pitfalls and promises for future drug development, *Biochemical Pharmacology*, 72(9): 1161– 1179
- DIEZ J. J., IGLESIAS P., 2003: The role of the novel adipocyte-derived hormon adiponectin in human disease, *Eur J Endocrinol*, 148: 293-300
- DUAN Y., LI F., LI L., FAN J., SUN X., YIN Y., 2014: n-6: n-3 PUFA ratio is involved in regulating lipid metabolism and inflammation in pigs, *British Journal of Nutrition*, 111: 445-451
- EBERLE D., HEGARTY B., BOSSARD P., FERRÉ P., FOUFELLE F., 2004: SREBP transkripční faktory: master regulátory lipidů homeostázy, *Biochemie*, 86 (11): 839-48
- FERNANDEZ-IGLESIAS A., QUESADA H., DIAS S., PAJUELO D., BLADE C., AROLA L., SALVADO M. J., MULERO M., 2013: DHA sensitizes FaO cells to tert-BHP-induced oxidative effects, Protective role of EGCG, *Food and Chemical Toxicology*, 62: 750-757
- FLOCK M. R., ROGERS C. J., SANDEEP PRABHU K., KRIS-ETHERTON P. M., 2013: Immunometabolic role of long-chain omega-3 fatty acids in obesity-induced inflammation, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 29, 431-445
- GEMMELMARK A., MADSEN T., VARMING K., LUNDBYE-CHRISTENSEN S., SCHMIDT E. B., 2012: Low-dose fish oil supplementation increases serum adiponectin without affecting inflammatory markers in overweight subjects, *Nutrition Research*, 32: 15-23

- GETHER U., 2000: Uncovering molecular mechanism involved in activation of G-protein-coupled receptors, *Endocrinology Review*, 21: 90-113
- GOLDSTEIN J. L., DE-BOSE-BOYD R. A., BROWN M. S., 2006: Protein sensors for membrane sterols, *Cell*, 124: 35-46
- GRAHAM T. L., MOOKHERJEE C., SUCKLING K. E., PALMER C. N., PATEL L., 2005: PPAR delta agonist GW0742X snižuje aterosklerózu v LDLR (- / -) myši. *Atherosclerosis*, 181: 29-37
- GREENE W. C., CHEN L. F., 2004: Regulation of NF- κ B action by reversible acetylation, *Novartis Found Sym*, 259, 208-217
- GUO J., LIU Z., SUN H., HUANG Y., ALBRECHT E., ZHAO R., YANG X., 2015: Lipopolysaccharide challenge significantly influences lipid metabolism and proteome of white adipose tissue in growing pigs, *Lipids in Health and Disease*, 14: 8
- HALL J. C. E., PRIESTLEY J. V., PERRY V. H., MICHAEL-TITUS A. T., 2012: Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, reduces the early inflammatory response following compression spinal cord injury in the rat, *Journal of Neurochemistry*, 121: 738-750
- HALUZÍK M., COLOMBO C., GAVRILOVÁ O., CHUA S., WOLF N., CHEN M., STANNARD B., DIETZ K. R., LE ROITH D., REITMAN M. L., 2003: Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice, *Diabetes*, 52 (Suppl 1): A328-A328
- HIRASAWA A., TSUMAYA K., AWAJI T., KATSUMA S., ADACHI T., YAMADA M., SUGIMOTO Y., MIYAZAKI S., TSUJIMOTO G., 2005: Free fatty acids regulate gut increting glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120, *Nat Med*, 11: 90-94
- HOLEČEK V., 2006: Metabolismus lipidů, *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*, Nakladatelství Grada Publishing a.s., Praha, 288s, 117-147, ISBN 80-2471-562-7
- HOUSOVÁ J., HOUSA D., HALUZÍK M., 2005: Adiponektin-nový adipocytární hormon se vztahem k obezitě a inzulínové rezistenci, *Vnitřní lékařství*, 51(2): 221-225

HOWE P. R. C., BUCKLEY J. D., MURPHY K. J., PETTMAN T., MILTE C., COATES A. M., 2014: Relationship between erythrocyte omega-3 content and obesity is gender dependent, *Nutrients*, 6: 1850-1860

HYBLEROVÁ D., 2014: *Vliv PUFA n-3 na expresi genů kódující proteiny řídící homeostázu cholesterolu*. Brno. Diplomová práce (nepublik., dep. knihovny Mendelovy Univerzity v Brně), Mendelova Univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chemie a technologie potravin, vedoucí práce: Prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda. CSc.

HYDEN M. S., GOSH S., 2008: Shared principles in NF-kappa B signaling, *Cell*, 132: 344-362

CHATTOPADHYAY N., SINGH D., HEESE O., GODBOLE M. M., SINOHARA T., BLACK P. M., et al., 2000: Expression of peroxisome receptors activated by proliferating cell nuclear antigen in human astrocytes: PPARgamma agonists as inducers of apoptosis, *Journal Neuroscience Research*, 61: 67-74

CHEN H., MONTAGNANI M., FUNAHASHI T., SHIMOMURA I., QUON M. J., 2003: Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells, *J Biol Chem*, 278: 45021-45026

CHEN Y. J., CHEN C. C., LI T. K., WANG P. H., LIU L. R., CHANG F. Y., WANG Y. C., YU Y. H., LIN S. P., MERSMANN H. J., DING S. T., 2012: Docosahexaenoic acid suppresses the expression of FoxO and its target genes, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23: 1609-1616

JANEČKOVÁ E., VAŠÍČKOVÁ M., 2015: *Genové exprese aneb co kódují geny* Mendelova interaktivní škola genetiky, Tribun EU, 2015, ISBN 978-80-263-0905-05

JOHANSSON I., MONSEN V. T., PETTERSEN K., MILDENBERGER J., MISUND K., KAARNIRANTA K., SCHONBERG S., BJORKOY G., 2015: The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2 in human retinal pigment epithelial cells, *Autophagy*, 11: 1636-1651

- KANAREK N, BEN- NERIAH Y., 2012: Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs. *Immunology Review*, 246 (1): 77– 94
- KÁŠ J., KODÍČEK M., VALENTOVÁ O., 2006: Laboratorní techniky biochemie, Nakladatelství VŠCHT Praha, 258s, 230-235, ISBN 978-80-7080-586-2
- KINGSMORE S. F., 2006: Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (4): 310-320
- KLUSÁČKOVÁ Z., SKOUMALOVÁ A., 2012: Úloha mastných kyselin v rozvoji Alzheimerovy choroby, *Klinická Biochemie a metabolismus* 3/2012, 182-187
- KOBAYASHI H., OUCHI N., KIHARA S., WALSH K., KUMADA M., ABE Y., FUNAHASHI T., MATSUZAWA Y., 2004: Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin, *Circ Res*, 94(4): 27-31
- KOMPRDA T., 2012: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review, *Journal of Functional Foods*, 4: 25-38
- KOMPRDA T., SLÁDEK Z., ŠKULTÉTY O., KŘÍŽKOVÁ S., ROZÍKOVÁ V., NĚMCOVÁ B., ŠUSTROVÁ T., VALOVÁ M., 2016 : Effect of dietary Schizochytrium mikroalga oil on selected markers of low-grade of inflammations in rats, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100: 1169-1178
- KOPP E. B., HAYDEN M. S., 1995: NF-kappa B and Rel proteins in initiate immunity, *Adv Immunology*, 58: 1-27
- LATRUFFE N., VAMECQ J., 1997: Peroxozómů proliferátory a peroxizómů proliferátory aktivované receptory (PPAR) jako regulátory metabolismu lipidů, *Biochemie*, 79 (2-3): 81-94
- LEE S. H., HANINNK M., 2002: Characterization of nuclear import and export functions of I- κ B, *Journal of Biology and Chemistry*, 22, 22

LEE C. H., OLSON P., EVANS R. M., 2003: Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors, *Endocrinology*, 144(6): 2201-2207

LEFEBVRE P., CHINETTI G., FRUCHART J. C., STAELS B., 2006: Třídění role PPAR alfa v energetickém metabolismu a cévní homeostázy. *Journal Clin Invest*; 116: 571-80

LIU L., HU Q. L., WU H. H., XUE Y. H., CAI L., FANG M., LIU Z. G., YAO P., WU Y. N., GONG Z. Y., 2016: Protective role of n-6/n-3 PUFA supplementation with varying DHA/EPA ratios against atherosclerosis in mice, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 32: 171-180

LONG Q., LEI T., FENG B., YIN C., JIN D., WU Y., ZHU X., CHEN X., GAN L., YANG Z., 2010: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ increases adiponectin secretion via transcriptional repression of endoplasmic reticulum chaperone protein ERp44, *Endocrinology*, 151: 3195-3203

MAEDA K., OKUBO K., SHIMOMURA I., FUNAHASHI T., MATSUZAWA Y., MATSUBARA K., 1996: cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most Abundant Gene transcript 1), *Biochem Biophys Res Commun*, 221(2): 286-289

MAEDA N., TAKASHI M., FUNAHASHI T., KIHARA S., NISHISAWA H., KISHIDA K., NAGARETANI H., MATSUDA M., KOMURO R., OUCHI N., KURIYAMA H., HOTTA K., NAKAMURA T., SHIMOMURA I., MATSUZAWA Y., 2001: PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein, *Diabetes*, 50(9): 2094-2099

MAKRIS C., ROBERTS J. L., KARIN M., 2002: The carboxyl-terminal region of I κ B kinase gamma (IKK γ) is required for full IKK activation, *Molecular Cell Biology*, 22(18): 6573–6581

MALEK S., CHEN Y., HUXFORD T., GOSH S., 2001: I κ B β , but not I κ B α , function as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells, *Journal of Biology and Chemistry*, 276: 4525-4532

MATĚJÍKOVÁ J., KUBICZKOVÁ L., SEDLAŘÍKOVÁ R., POTÁČOVÁ A., HÁJEK R., ŠEVČÍKOVÁ S., 2013: Degradace proteinů ubikvitin – proteázomovou dráhou, *Klinická onkologie*, 26(4): 251-256

MICHALIC L., WAHIL W., 2006: Zapojení PPAR nukleárních receptorů v poranění tkáně a opravy ran, *Journal Clin Ivestig*, 116: 598-606

MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A., PODWELL V., 2001: *Harperova biochemie*, 3. Vydání, Jinočany: Nakladatelství H&H, 872s, ISBN 80-7319-003-6

OH D. Y., TALUKDAR S., BAE E. J., IMAMURA T., MORINAGA H., FAN W., LI P., LU W., WATKINS S. M., OLEFSKY J. M., 2010: GPR120 is an Omega-3 Fatty Acids Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects, *Cell*, 142(5): 687-698

OLIVER E., MCGILLICUDY F. C., HARFORD K. A., REYNOLDS C. M., PHILLIPS C. M., FERGUSON J. F., ROCHE H. M., 2012: Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocyte-specific differential effects between LC n-3 PUFA, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23: 1192-1200

PAHL H. L., 1999: Activators and target genes of Rel/ NF- kappaB transcription factors, *Oncogene*, 1999, 18(49): 6853– 6866

PAJVANI U. B., DU X., COMBS T. P., BERG A. H., RAJALA M. W., SCHULTLESS T., ENGEL J., BROWNLEE M., SCHERER E. P., 2003: Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity, *Journal Bio Chem*, 278(11): 9073- 9085

PASCHOAL V. A., VINOLO M. A. R., CRISMA A. R., MAGDALON J., CURI R., 2013: Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function vitro, *Lipids*, 48: 93-103

PETURSDOTTIR D. H., HARADRDOTTIR I., 2007: Dietary fish oil increases the number of splenic macrophages secreting TNF- α and IL-10 but decreases the secretion of these cytokines by splenic T cells from mice, *Journal of Nutrition*, 137: 665-670

PUGLISI M. J., HASTY A. H., SARASWATHI V., 2011: The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22: 101-108

RAMAKRISHNAN P., WANG W., WALLACH D., 2004: Receptor-specific signaling for both alternative and canonical NF- κ B activation pathways by NF- κ B-inducing kinase, *Immunity*, 21: 477-489

RUBENSTEIN P. A., 1990: The functional importance of multiple actin isoforms, *Bioessays*, 12: 309-315

SANDEEP T., PARAS G., ARMINDER S. S., CHAITNYA K., SAURABH S., 2011: The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases, *Journal of Advanced Pharmaceuticals Technology and Research*, 2(4): 236-240

SEN R., BALTIMORE D., 1986: Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer binding protein Nf- kappa B by a post-translational mechanism. *Cell* 1986; 47(6): 921–928

SCHERER P. E., WILLIAMS S., FOGLIANO M., BALDINI G., LODISH H. F., 1995: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, *J Bio Chem*, 270(45) 26746- 9

SCHMITZ G., ECKER J., 2008: The opposite effect of n-3 and n-6 fatty acids, *Prog. Lipid Res.*, 47: 147-155

SCHOONJANSK K., STAELS B., AUWERX J., 1996: Úloha Peroxizomovém proliferátorem aktivovaného receptoru (PPAR), ve zprostředkování účinků fibrátů a mastných kyselin na genovou expresi, *Journal of lipid Research*, 37(5): 907-25

SHAO W., ESPENSHADE P. J., 2012: Expanding roles for SREBP in metabolism, *Cell Metabolism*, 16(4): 414-419

SHIMANO H., 2001: Sterolů regulační element vázající proteiny (SREBPs): transkripční regulátory lipidů syntetických genů, *Prog Lipid Res*, 40 (6): 439-52

SIMOPOULOS A. P., 2005: Fatty acids – Omega-3 Polyunsaturated, *Encyklopedia in human nutrition*, 2. vydání, 205-219, ISBN 978-0-12-226694-12

SIRIWARDHANA N., KALUPAHANA N., S., CEKANOVA M., LEMIEUX M., GREER B., MOUSTAID-MOUSSA N., 2013: Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 613-623

STROUHALOVÁ E., 2015: *Vliv polynenasycených mastných kyselin n-3 na expresi vybraného genu u modelového organismu*. Brno. Diplomová práce (nepublik., dep. Knihovny Mendelovy Univerzity v Brně), Mendelova Univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chemie a technologie potravin, vedoucí práce: Prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda. CSc.

SVAČINA Š. A KOLEKTIV, 2008: Základní složky výživy, *Klinická dietologie*, Nakladatelství Grada Publishing a.s., Praha, 384s, 27-35

SUNDARAM S., BUKOWSKI M. R., LIE W. R., PICKLO M. J., YAN L., 2016: High-fat diets containing different amounts of n3 and n6 polyunsaturated fatty acids modulate inflammatory cytokine production in mice, *Lipids*, 51: 571-582

ŠMAHELOVÁ A., 2004: Receptory aktivované perioxozovými proliferátory a inzulínové receptory v mozku, Diabetes a neuropsychická onemocnění, *Vnitř. Lék*, 51(52): 565-8

TAM W. F., SEN R., 2001: I-κB family members function by different mechanism, *Journal of Biology and Chemistry*, 276s

UPADHAYA S. D., KIM J. C., MULLAN B. P., PLUSKE J. R., KIM I. H., 2015: Vitamin E and omega-3 fatty acids independently attenuate plasma concentrations of proinflammatory cytokines and prostaglandin E2 in Escherichia coli lipopolysaccharide-challenged growing-finishing pigs, *Journal of Animal Science*, 93: 2926-2934

VAISMAN N., ZARUK Y., SHIRAZI I., KAYSAR N., BARAK V., 2005: The effect of fish oil supplementation on cytokine production in children, *European Cytokine Network*, 16: 194-198

VIGERUST N. F., BJØRNDAL B., BOHOV P., BRATTELID T., SVARDAL A., BERGE R. K., 2013: Krill oil versus fish oil in modulation of inflammation and lipid metabolism in mice transgenic for TNF- α , *European Journal of Nutrition*, 52: 1315-1325

WANG X., SATO R., BROWN M. S., HUA X., GOLDSTEIN J. L., 1994: SREBP-1, membránově vázané transkripční faktor uvolní sterolů regulované proteolýzy, *Cell*, 77 (1): 53-62

WU J. H. Y., CAHILL L. E., MOZAFFARIAN D., 2013: Effect of fish oil on circulating adiponectin: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 98: 2451-2459

WILSON S. J., WALLIN A., DELLA-CIOPPA G., SANDSTROM T., HOLGATE S. T., 2001: Effects of budesonide and formoteol on NF- κ B, adhesion molecules, and cytokines in asthma, *Journal Respire Critical Care Med*, 164s, 1047-1052

YAMAUCHI T., KAMON J., ITO Y., TSUCHIDA A., YOKOMIZO T., KITA S., SUGIYAMA T., MIYAGISHI M., HARA K., TSUNODA M., MURAKAMI K., OHTEKI T., UCHIDA S., TAKEKAWA S., WAKI H., TSUNO N. H., SHIBATA Y., TERAUCHI Y., FROGUEL P., TOBE K., KOYASU S., TAIRA K., KITAMURA T., SHIMIZU T., NAGAI R., KADOWAKI T., 2003: Klonování adiponektinových receptorů, které zprostředkovávají anti-diabetické metabolické účinky, *Nature*, 423: 762-769

YOSHIMURA S., BONDESON J., FOXWELL B. M., BRENNAN F. M., FELDMANN M., 2001: Effective antigen presentation by dendric cells in NF- κ B dependent coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines, *Int Immunology* 13, 675-683

ZEHNÁLEK J., 2005: *Biochemie-cvičení*, 2. vydání, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 72s.

ZEMAN M., ŽÁK A., VECKA M., TVRZICKÁ E., PÍSAŘÍKOVÁ A., STANKOVÁ B., 2006: N-3 fatty acid supplementation decreases plasma homocysteine in diabetic dislipidemia treated with statin-fibrate combination, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 397-384, ISSN 1873-4847

ZHANG C. C., YU H. N., SHEN Y. Z., NI X. F., DAS U. N., 2015: Polyunsaturated fatty acids trigger apoptosis of colon cancer cells through a mitochondrial pathway, *Archives of Medical Science*, 11: 1081-1094.

ZHU H., SNYDER M., 2003: Protein chip technology, *Curr Opin Chem Biol*, 7(1): 55-63

ZHU H., LIU Y., CHEN S., WANG X., PI D., LENG W., CHEN F., ZHANG J., KANG P., 2016: Fish oil enhances intestinal barrier function and inhibits corticotrophin-releasing hormone receptor 1 signalling pathway in weaned pigs after lipopolysaccharide challenge, *British Journal of Nutrition*, 115: 1947-1957

ŽÁK A., TVRZICKÁ E., ZEMAN N., VECKA M., 2005: Patofyziologie a klinický význam vícenenasycených mastných kyselin řady n-3, *Časopis lékařů českých*, 144s, 6-18

INTERNETOVÉ ZDROJE

Eikosanoidy [online], autor Rovenská M., 2009, LF Motol, Masarykova Univerzita, dostupné z: <http://stary.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/eikosanoidy.ppt>

Genetika zvířat [online], autor Urban T., 2014, poslední editace 30. 7. 2014, dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1464

Chemické listy [online], autor Zámotný P., Asociace českých chemických společností, 2017, ISSN 1213-7103, 0009-2770, dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/cz/index.html>

Patologie zánětu [online], autor Kodoušek R., 2012, Ústav patologie, LF-UP Olomouc, 10/2012, dostupné z: <http://docplayer.cz/25736806-Patologie-zanetu-prof-mudr-rostislav-kodousek-drsc-ustav-patologie-lf-up-olomouc.html>

Peroxisome Proliferator-activated receptors [online], autor King M., W., 2016, poslední editace 3. 11. 2016 The Medical Biochemistry page. org, dostupné z: <http://themedicalbiochemistrypage.org/ppar.php>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obsah

Obr. 1 Strukturní vzorec kyseliny palmitové a stearové.....	13
Obr. 2 Cis a trans konfigurace MK.....	13
Obr. 3 Strukturní vzorce polynenasycených mastných kyselin ω -3, ω -6.....	14
Obr. 4 Metabolismus polynenasycených mastných kyselin řady n-3 a n-6.....	16
Obr. 5 Biosyntéza eikosanoidů z LA, ALA.....	17
Obr. 6 Genová exprese.....	24
Obr. 7 Signální dráha rodiny nukleárních receptorů PPAR.....	28
Obr. 8 Kanonická aktivační dráha NF- κ B.....	32
Obr. 9 Kanonická a nekanonická aktivační dráha NF- κ B.....	33
Obr. 10 Elektrobloťing.....	38
Obr. 11 Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza.....	40
Obr. 12 Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza.....	40
Obr. 13 Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza.....	41
Obr. 14 Plazmatická koncentrace adiponektinu.....	53
Obr. 15 Koncentrace adiponektinu v tukové tkáni.....	54
Obr. 16 Koncentrace PPAR γ v tukové tkáni.....	55
Obr. 17 Koncentrace pNF- κ B v tukové tkáni.....	57
Obr. 18 Plazmatická koncentrace vybraných cytokinů.....	59

SEZNAM TABULEK

Obsah

Tab. 1 Celkové složení krmných směsí.....	44
Tab. 2 Obsah MK v krmné směsi	45
Tab. 3 Průměrná spotřeba krmiva	50
Tab. 4 Průměrný denní přírůstek, živá hmotnost prasat, příjem EPA a DHA	51
Tab. 5 Integrál intenzity chemiluminiscence po stimulaci zymosanem a PMA	52

SEZNAM ZKRATEK

AA	arachidonová kyselina
ALA	α -linolenová kyselina
AMK	aminokyselina
AMPK	AMP-kináza
AP	alkalická fosfatáza
BAFF-R	B buňky aktivující faktor receptor
BCR	B-buněčné receptory
BSA	bovinní sérum albumin
cAMP	cyklický adenosin monofostát
CL	stimulovaná chemiluminiscence
COX	cyklooxygenáza
DGLA	dihomo- γ -linolenová kyselina
DBD	DNA vázebná doména
DHA	dokosahexanová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPA	eikosapentanová kyselina
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GLA	γ -linolenová kyselina
GPCR	G-receptory párované s proteiny
HETE	hydroxyeikosatraenové kyseliny
HNF	hepatocytární nukleární faktor
HPR	křenová peroxidáza
IG	imunoglobulin
IKK	inhibitor kináza
IL-1	interleukin 1
IL-1R	interleukin 1 receptor
Da	Dalton
LA	linolová kyselina
LBD	ligand vázající doména
LBR	lymfotoxin β receptor
LTC ₄	leukotrieny
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou

LPS	lipopolysacharid
LOX	lipoxygenáza
LTB ₄	cytoooxygenázový produkt 4
LXA ₄	lipoxiny A ₄
LXR	jaderní X receptor
MK	mastné kyseliny
mRNA	mediátorová (messengerová) RNA
MO	mikroorganismy
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
N-CoR	nukleární receptor co-repressor
NF1	jaderný faktor 1
NF- $\kappa\beta$	jaderný faktor $\kappa\beta$
NIK	NF- κB -inducibilní kináza
NLS	jaderný lokalizační signál
NPD1	neuroprotektin D1
PAGE	polyakriamidová gelová elektroforéza
PGE	prostaglandin
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PMA	forbol myristát acetát
PPAR	receptor aktivované proliferátory peroxizomů
PPREs	PPAR-responzivní elementy
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
PVDF	polyvinyl
RANK	receptor aktivátor NF- κB
RHD	Rel homologní doména
RXR	retinoidní X receptor
SDS	dodecyl-sulfát sodný
SREBP	sterol regulační vazebný protein
SRS-A	pomalou-reagující anafylaktická substance
TAD	transaktivační doména
TCR	T-buněčné receptory
TF	transkripční faktor
TLR	receptor podobný genu <i>Toll</i>
TNF	tumor nekrotizující faktor

TNFR	tumor nekrotizující faktor receptor
TXA ₂	tromboxany A ₂
TZDs	thiazolidindiony