

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav technologie potravin



**Vliv polynenasycených mastných kyselin n-3 na
markery zánětu u modelového organismu**

Diplomová práce

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

Vypracovala:
Bc. Petra Pešková

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci na téma vliv polynenasycených mastných kyselin na markery zánětu u modelového organismu 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 *Směrnicí 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 prof. MVDr. Ing. Tomáši Komprdovi, CSc. za cenné rady, konzultace a odborné vedení při zpracování diplomové práce.

Dále děkuji Interní grantové agentuře Mendelovy univerzity v Brně za poskytnuté finanční prostředky při řešení projektu TP3/2014 Vliv kyseliny dokosahexaénové na markery zánětu u modelového organismu.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že n-3 polynenasycené mastné kyseliny potlačují rozvoj mírného chronického zánětu. Experiment probíhal na potkanech krmených rozdílnými dietami (kontrolní, s přidavkem oleje ze světlice barviřské, rybiho oleje a oleje z řasy *Schizochytrium*). Při zpracování výsledků z odebraných tkání bylo použito stanovení exprese vybraných genů pomocí qRT-PCR, zjištění zastoupení proteinů v cytosolu a jaderné frakci pomocí Western-blotu a kvantifikace cytokinů ELISA metodou. Podávání oleje z řasy *Schizochytrium* vedlo ke snížení konečné hmotnosti a glykémie, dále ke zvýšení exprese PPAR- γ a zvýšené produkci protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β 1. Naopak nebyl pozorován rozdíl v expresi *GPR120* a receptorů pro adiponektin ani v množství proteinů NF- κ B a PPAR- γ mezi jednotlivými dietami. Byla zjištěna zvýšená plazmatická koncentrace adiponektinu. Z výsledků experimentu vyplývá, že je možné doporučit olej z řasy *Schizochytrium* jako vhodný doplněk humánní stravy jako prevence vzniku chronických degenerativních onemocnění.

Klíčová slova: EPA, DHA, adiponektin, PPAR- γ , NF- κ B, n-3, n-6, cytokiny

The aim of this thesis was to verify the hypothesis implying that n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the development of mild chronic inflammation. The experiment was conducted on rats with different diets (control, with the addition of safflower oils, fish oils and oils from algae *Schizochytrium*). For processing the results of the collected tissues was used determination of expression of selected genes by qRT-PCR, detection of proteins and in the cytosol and nuclear fractions by Western blot and the quantification of cytokines by ELISA. Feeding oil from algae *Schizochytrium* has led to lowering the final weight and blood glucose, further to enhance expression of PPAR- γ and increasing the production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β 1. In contrast, no difference was observed in the expression of *GPR120* and adiponectin receptors or proteins in an amount of NF- κ B and PPAR- γ between diets. Elevated plasma levels of adiponectin were found. The results of the experiment shows that it is possible to recommend oil from algae *Schizochytrium* as a useful supplement of human diet as prevention of chronic degenerative diseases.

Keywords: EPA, DHA, adiponectin, PPAR- γ , NF- κ B, n-3, n-6, cytokines

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
2.1 LIPIDY	9
2.1.1 <i>Struktura a dělení mastných kyselin</i>	9
2.1.2 <i>Syntéza a odbourávání mastných kyselin</i>	10
2.1.3 <i>Výskyt mastných kyselin</i>	11
2.1.4 <i>Metabolismus n-3 a n-6 PUFA</i>	11
2.1.5 <i>Účinky n-3 a n-6 PUFA na organizmus</i>	13
2.1.5.1 <i>Vliv na kardiovaskulární systém</i>	14
2.1.5.2 <i>Vliv na centrální nervový systém</i>	15
2.1.5.3 <i>Vliv na nádorová onemocnění</i>	16
2.1.5.4 <i>Vliv na zánět a imunitu</i>	17
2.2 MODULACE GENOVÉ EXPRESE VLIVEM PUFA	20
2.2.1 <i>PPAR</i>	21
2.2.2 <i>LXR a HNF</i>	23
2.2.3 <i>SREBP</i>	24
2.2.4 <i>GPR120</i>	24
2.2.5 <i>AdipoR</i>	25
2.2.6 <i>NF-κB</i>	26
2.3 OBECNÉ PRINCIPY POUŽITÝCH METOD	27
2.3.1 <i>Real-time PCR (qRT-PCR)</i>	27
2.3.2 <i>ELISA</i>	28
2.3.3 <i>Western-blotting</i>	28
2.3.4 <i>Stanovení mastných kyselin</i>	29
3 CÍLE PRÁCE.....	30
4 MATERIÁL A METODIKA	31
4.1 POKUSNÁ ZVÍŘATA, CHOVNÉ PODMÍNKY A ODBĚR TKÁNÍ	31
4.2 KVANTIFIKACE GENOVÉ EXPRESE	33
4.3 STANOVENÍ PROTEINŮ – ADIPONEKTINU, PPAR-Γ A NF-κB	34
4.4 STANOVENÍ ADIPONEKTINU A VYBRANÝCH CYTOKINŮ V PLAZMĚ	35
4.5 STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN, GLYKÉMIE A TAG	36
4.6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	36
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	37
5.1 HMOTNOST A PŘÍJEM KRMIVA POKUSNÝCH ZVÍŘAT	37

5.2 KVANTIFIKACE GENOVÉ EXPRESE	39
5.3 ZASTOUPENÍ EPA, DHA A KONCENTRACE PROTEINŮ VE TKÁNÍCH	40
5.4 STANOVENÍ CYTOKINŮ.....	47
6 ZÁVĚRY	51
7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	53
8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	64
9 SEZNAM ZKRATEK.....	66

1 ÚVOD

V současné době je věnována velká pozornost výzkumu působení polynenasycených mastných kyselin na lidské zdraví a ukazuje se, že jejich zapojení je vysoce komplexní. Podílí se na zánětlivé odpovědi organismu, vzniku a vývoji aterosklerózy či některých typů rakoviny. Dále jsou důležité pro správné fungování centrálního nervového systému, což je nepostradatelné pro vývoj plodu, kognitivních funkcí a také například ovlivňují manifestaci některých neurodegenerativních poruch.

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) nejvíce zastoupené v lidské stravě se řadí k n-3 a n-6 rodinám. Zatímco dříve byly konzumovány ve vyváženém poměru, dnešní strava obsahuje výrazně vyšší podíl PUFA rodiny n-6. V potravinách jsou PUFA rodiny n-6 nejčastěji zastoupeny v běžných rostlinných olejích, zatímco n-3 PUFA můžeme najít v mořských řasách či rybách. Vysoké zastoupení n-6 PUFA je spojováno se vznikem civilizačních chorob, které způsobují řadu předčasných úmrtí, díky čemuž jsou intenzivně zkoumány mechanismy působení PUFA na lidský organizmus.

Cílem našeho experimentu bylo potvrdit hypotézu, že mírný chronický zánět v organismu může být potlačen působením n-3 PUFA, přičemž jsme předpokládali, že kyselina dokosaheptaenová bude mít větší vliv na jeho zlepšení než kyselina eikosapentaenová.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Lipidy

Lipidy patří mezi organické látky rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech, ve vodě jsou rozpustné jen zčásti nebo vůbec. Mají nezastupitelné funkce v organismu - jsou součástí biomembrán, poskytují vydatný zdroj energie, který tělo využívá i jako rezervu uloženou v adipocytech. Dále chrání orgány, zabraňují ztrátám tepla a v neposlední řadě usnadňují vstřebávání některých vitaminů, cholesterol také slouží pro syntézu steroidních hormonů. Lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů.

2.1.1 Struktura a dělení mastných kyselin

Mastné kyseliny se v přírodě vyskytují především v esterifikované formě jako důležitá součást lipidů, nejčastěji mají sudý počet uhlíků a lineární řetězec. Mastné kyseliny obsahují na jednom konci karboxylovou COOH a na druhém metylenovou CH₃ skupinu.

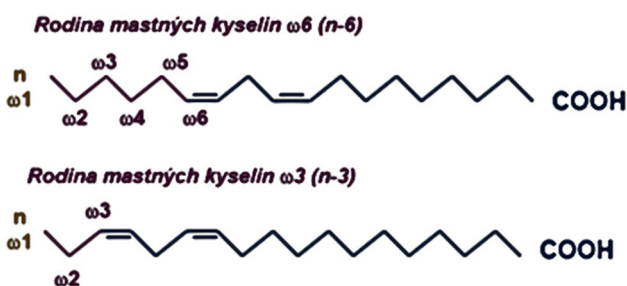
Mastné kyseliny lze dělit podle délky řetězce, stupně nasycení či rozvětvenosti. Podle stupně nasycení rozlišujeme nasycené, ty lze dále dělit na vyšší a nižší, a nenasycené mastné kyseliny, které rozdělujeme podle počtu dvojných vazeb na:

- Monoenové obsahující pouze jednu dvojnou vazbu (např. kyselina olejová),
- Polyenové (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) se dvěma a více dvojnými vazbami (např. kyselina linolenová, arachidonová a linolová),
- Eikosanoidy, které jsou odvozeny od PUFA s 20 uhlíky (eikosa-), řadíme sem prostanoidy (dále se dělí na prostaglandiny, prostacykliny a thromboxany) a leukotrieny (Murray *et al.*, 2002).

Dvojně vazby těchto mastných kyselin jsou většinou nekonjugované (neleží tedy vedle sebe) s *cis* (*Z*) konfigurací, což znamená, že obě části řetězce jsou v jedné rovině, svírají úhel 120° a oddělují je metylenové skupiny. Existují však i sloučeniny v konfiguraci *trans* (*E*), v přírodě jsou méně běžné, vyskytují se v mikroorganismech, ve vodních organismech a v semenech některých rostlin. Potravou jsou však častěji přijímány ve formě vedlejších produktů hydrogenace nenasycených mastných kyselin

především v průběhu výroby margarínů ztužováním rostlinných olejů. U těchto sloučenin bylo popsáno nepříznivé působení na lidské zdraví, například zvýšením hladiny LDL lipoproteinů či inhibicí přeměny a začleňování mastných kyselin do buněčných membrán (Simopoulos, 2002).

Podle umístění první dvojné vazby od metylenového uhlíku rozlišujeme ω -11, ω -9, ω -7, ω -6, ω -5 a ω -3 mastné kyseliny, v současné době je spíše používáno označení n-11, n-9 atd. V této práci jsme se věnovali ω -3 a ω -6 kyselinám (obr. 1).



Obr. 1: Struktura polynenasycených mastných kyselin ω -3 a ω -6 (převzato a upraveno z: http://che1.lf1.cuni.cz/html/Mastne_kyseliny_2sm.pdf).

2.1.2 Syntéza a odbourávání mastných kyselin

Mastné kyseliny se do těla dostávají společně s potravou nebo v těle vznikají *de novo* lipogenezí probíhající v játrech, odkud jsou transportovány pomocí plazmatických lipoproteinů, konkrétně VLDL (*very low density lipoproteins*) částic do tukových tkání.

V organismu mohou být mastné kyseliny odbourávány pomocí oxidace na acetyl-CoA. Ten je buď zcela oxidován v citrátovém cyklu na CO_2 a H_2O , dále může sloužit jako zdroj uhlíkových atomů pro syntézu steroidů, nebo se účastní syntézy ketolátek v játrech. Ketolátky slouží jako významný zdroj energie například při hladovění (Murray *et al.*, 2002). Je popsáno více mechanismů zprostředkovaných odbourávání mastných kyselin, vždy se jedná o oxidace, rozlišují se však podle uhlíku, na kterém probíhají na α -, β - a ω -oxidace. Hlavní metabolickou dráhou je β -oxidace. β -oxidace je složitý sled reakcí, kterému předchází degradace triacylglycerolu na glycerol a tři mastné kyseliny, které jsou k potřebným buňkám krví transportovány navázané na albumin. V buňce dochází k jejich aktivaci, kdy pomocí ATP, CoA a enzymu acyl-CoA-syntetázy vzniká makroergický thioester acyl-CoA. Aktivovaná mastná kyselina vstupuje přímo do mitochondrie nebo v případě delších řetězců (více než 12 uhlíků) do peroxizomu.

V peroxizomu dochází k jejímu zkrácení a následnému transportu do mitochondrie. V mitochondriích již probíhá vlastní oxidace pomocí postupného odštěpování dvou uhlíků z karboxylového konce. Tato reakce se sestává ze čtyř kroků: dehydrogenace, kdy dochází ke ztrátě dvou vodíků za vzniku dvojně vazby, následuje hydratace, tedy adice H₂O na dvojnou vazbu za vzniku hydroxykyseliny, dalším krokem je opět dehydrogenace, po níž vzniká ketokyselina, a na závěr probíhá thiolýza. Při thiolýze je pomocí enzymu beta-ketothioláza odštěpen acetyl-CoA a zbytek vstupuje do dalšího cyklu, dokud není zcela odbourán. Při oxidaci nenasycených mastných kyselin vznikají *trans* izomery a dochází k posunu dvojně vazby, získá ATP je při této reakci nižší než u nenasycených mastných kyselin, jelikož není nutná dehydrogenace acyl-CoA.

Mastné kyseliny také mohou být esterifikovány na acylglyceroly a slouží tak jako významná zásobárna energie.

2.1.3 Výskyt mastných kyselin

Nasycené mastné kyseliny obsahují zejména živočišné produkty, například mléko a výrobky z něj, maso či uzeniny. Naopak nenasycené mastné kyseliny jsou zastoupeny především v rostlinných tucích, výjimečně i v tucích živočišných, a to především v rybách a krilu. Rodina mastných kyselin n-6 se vyskytuje zejména v rostlinných semenech, například ve slunečnicových, dýňových či sezamových, dále v kukuřici, ořeších, masu či mléčných výrobcích. Naopak n-3 mastné kyseliny nalezneme v tučných mořských rybách (sleď, makrela, losos, tuňák či sardinka), dále v mořských řasách a v řepkovém či lněném semínku (Grofová, 2010). Mezi významné zástupce n-3 kyselin patří α -linolenová (ALA), eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA), mezi n-6 kyseliny řadíme linolovou (LA).

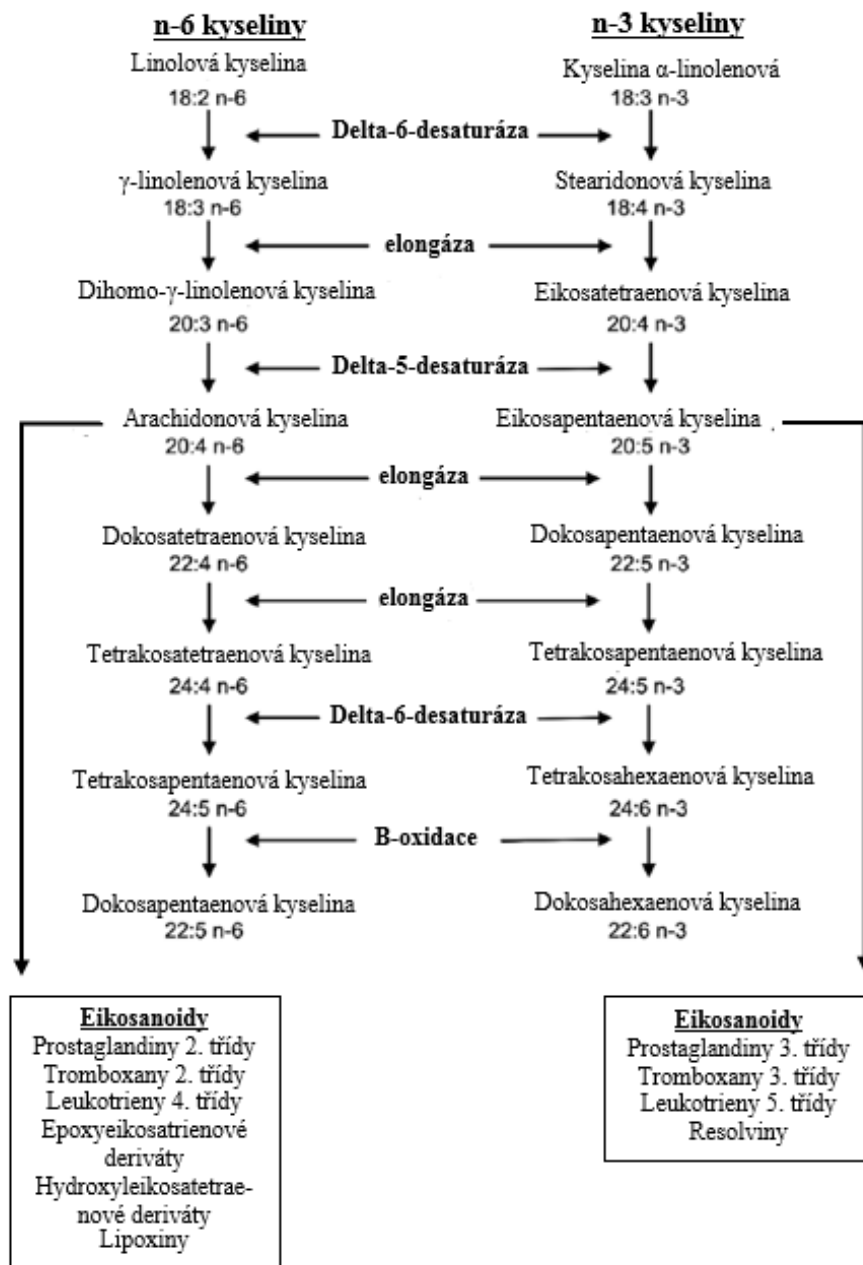
2.1.4 Metabolismus n-3 a n-6 PUFA

Obě rodiny polynenasycených mastných kyselin n-3 i n-6 řadíme mezi esenciální. Lidské tělo si je nedokáže samo syntetizovat, jelikož první uhlík, na který je organismus schopen vnést dvojnou vazbu, je až devátý (Žák *et al.*, 2005). Musíme je tedy přijímat potravou.

Kyselina linolová (LA) a α -linolenová (ALA) hrají významnou roli v organismu jako

prekurzory pro biosyntézu eikosanoidů, mezi které řadíme prostaglandiny, leukotrieny a tromboxany. Eikosanoidy jsou signální molekuly s důležitou funkcí například v imunitní odpovědi či při srážlivém procesu (Peč a Dušek, 2008). Enzymem pro tvorbu prostaglandinů je cyklooxygenáza (COX), zatímco syntézu leukotrienů katalyzuje lipoxygenáza (LOX), dále existuje dráha cytochromu P450 monooxygenázy. Metabolizací n-3 PUFA vznikají tromboxany a prostaglandiny 3. třídy a leukotrieny 5. třídy, zatímco u n-6 PUFA jsou to tromboxany a prostaglandiny 2. třídy a leukotrieny třídy 4. Čísla jednotlivých tříd vyjadřují počet dvojných vazeb vyskytujících se v molekule.

Jak LA, tak ALA jsou metabolizovány stejnými enzymy – desaturázami a elongázami, jelikož enzymů je omezené množství, n-3 a n-6 rodiny kyselin o ně soutěží a zvýšený příjem jedné způsobí významné snížení přeměny rodiny druhé (Schmitz a Ecker, 2008). Prvním krokem metabolizace LA je delta-6-desaturace na γ -linolenovou kyselinu (GLA), ta je poté elongována na dihomu-GLA (DGLA), která je prekurzorem pro tvorbu prostaglandinů 1. třídy. DGLA může být delta-5-desaturací převedena na kyselinu arachidonovou, ze které jsou tvořeny prostaglandiny a tromboxany 2. třídy a leukotrieny 4. třídy. Stejným mechanismem je ALA metabolizována na eikosapentaenovou kyselinu (EPA) sloužící pro syntézu prostaglandinů a tromboxanů 3. třídy a leukotrienů 5. třídy (Das, 2006; obr. 2). EPA je dále pomocí elongace, desaturace a β -oxidace převedena na DHA. K této přeměně dochází především v centrálním nervovém systému. Jen velmi malé procento ALA je u člověka konvertováno na DHA. Literatura uvádí hodnoty pohybující se kolem 4 – 5%, přičemž u žen je působením estrogenů zvýšená a může dosahovat až 21% (Burdge, 2004). Jak je z uvedených hodnot patrné, nedochází k dostatečné konverzi a je tedy nutné přijímat EPA a DHA potravou. V organismu je také uskutečňována retrokonverze DHA na EPA, což se ukazuje jako fyziologicky významný proces (Žák *et al.*, 2005).



Obr. 2: Metabolismus n-6 a n-3 PUFA, čísla uvedená pod názvy molekul udávají počet uhlíků a dvojných vazeb (převzato a upraveno z Schmitz a Ecker, 2008).

2.1.5 Účinky n-3 a n-6 PUFA na organismus

Jednotlivé metabolity, respektive eikosanoidy, tvořené z n-3 a n-6 PUFA mají na organismus zcela jiný účinek. Eikosanoidy jsou signální molekuly účastníci se řady biologických procesů a většinou jsou spřaženy s G-proteinem. Mezi důležité procesy, do kterých jsou zapojeny, můžeme zařadit syntézu kanabinoidů (látky uvolňované mozkem při stimulaci neuronů), zánětlivou odpověď organismu, aktivační i inhibiční působení na

DNA, diferenciaci buněk, proces srážení krve a mnoho dalších (Jirák a Zeman, 2007). V současné době jsou také předmětem zájmu studia neurologických funkcí a psychiatrických poruch.

V důsledku zvýšeného příjmu n-6 PUFA obsažených v moderním stylu stravování dochází ke zvýšené produkci eikosanoidů vznikajících z LA. Tyto eikosanoidy jsou biologicky aktivní již ve velmi malých množstvích a jejich nadměrná syntéza vede ke vzniku trombů a nerovnováze imunitního systému (prozánětlivé působení, možný vznik alergií). Jejich prosrážlivý efekt je zapříčiněn zvýšením viskozity krve, vznikem vazospasmů (křečovitě zúžení cév) a vazokonstikcí (zúžení cév), také snižují dobu krvácení (Simpoulos, 2002). Naopak zvýšený příjem n-3 PUFA snižuje viskozitu krve a zvyšuje elasticitu buněčných membrán, což se projevuje především u erytrocytů v podobě zlepšení mikrocirkulace a přívodu kyslíku do tkání díky jejich zvýšené deformabilitě. Eikosanoidy vznikající z n-3 PUFA působí protizánětlivě, vasodilatačně (rozšiřuje cévy) a protisrážlivě, jsou proto považovány za jeden z faktorů prevence kardiovaskulárních onemocnění. Současné výzkumy také prokázaly, že snižují riziko výskytu rakoviny (Wang a DuBois, 2010) a autoimunních onemocnění. Vyvážený poměr n-3 a n-6 PUFA je také důležitý pro udržování homeostázy a normální vývoj organismu (Simopoulos, 2002). Jejich nedostatek naopak může vést k manifestaci duševních poruch, zhoršení paměti, retardaci vývoje, zhoršení imunity, poruchám vidění, svalové slabosti či třesu. Doporučený poměr příjmu n-6 a n-3 PUFA je 1-1,5 : 1, který je velmi rozdílný od moderní stravy, kde se pohybuje od 10 do 20 – 25 : 1 (Simopoulos, 2011).

2.1.5.1 Vliv na kardiovaskulární systém

Nejčastější komplikací vedoucí ke vzniku koronárních ateroskleróz, které mohou vyústit v infarkt myokardu, jsou trombózy. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) umírá každý rok přibližně 17 miliónů lidí na kardiovaskulární nemoci. Díky protisrážlivému působení n-3 PUFA je jim věnována velká pozornost.

Byla provedena řada studií věnujících se pozitivnímu působení n-3 PUFA na kardiovaskulární systém, ze kterých vyplývá:

- EPA potlačuje syntézu tromboxanů 2. třídy indukujících agregaci krevních destiček a zúžení cév.

- Zvyšují produkci prostacyklinu, což je prostaglandin přispívající k rozšíření cév a potlačující adhezi krevních destiček.
- Studie na pokusných myších, u kterých byl proveden knock-out LDL receptoru, prokázaly pozitivní působení EPA a DHA na potlačení vývoje aterosklerózy (Brown *et al.*, 2013, Gladine *et al.*, 2014).
- Zvýšený příjem n-3 PUFA ve formě konzumace tučných mořských ryb jedenkrát týdně působí jako sekundární prevence infarktu a je spojeno s 16% poklesem rizika vzniku fatálních srdečních onemocnění a 14% snížením rizika mrtvice (Kromhout, 2014).
- Byl popsán pozitivní vliv n-3 PUFA spojený s výskytem fibrilací komor, avšak studie ovlivnění fibrilaci síní se ve svých závěrech rozcházejí. Heidt *et al.* (2009) prokázali významné snížení výskytu fibrilací síní po podávání vysoké dávky n-3 PUFA nitrožilně. Naopak studie Sanderasa *et al.* (2012) neukázala žádné zásadní rozdíly u testovaných skupin - první se zvýšenými dávkami n-3 PUFA a druhé pouze s placebem.
- Zvýšený příjem n-3 PUFA snižuje množství volných triacylglycerolů v krvi, má efekt na snížení krevního tlaku a zvyšuje hladinu HDL cholesterolu (Balk *et al.*, 2006).
- PUFA rodiny n-3 ovlivňují produkci oxidu dusnatého, a tím působí na endoteliální relaxaci a podporují pružnost arterií (Harris *et al.*, 1997).

Je však třeba mít na paměti, že choroby kardiovaskulárního systému vykazují multifaktoriální dědičnost a na jejich projevu se také významně projevují vlivy prostředí, proto zvýšený příjem n-3 PUFA zůstává pouze jedním z mnoha faktorů, které je ovlivňují.

2.1.5.2 Vliv na centrální nervový systém

PUFA rodiny n-3 hrají významnou roli v činnosti nervového systému, kognitivním vývoji, vzniku synapsí a přenosu signálu na synapsích.

Byl popsán vliv nedostatku n-3 PUFA na opožděný rozvoj kognitivních a behaviorálních funkcí v dětství (Freemantle *et al.*, 2006). Vyvážený poměr n-3 a n-6 PUFA předchází vzniku a vývoji mnoha neurologických poruch, díky zprostředkování efektivní zánětlivé odpovědi a jejich roli v metabolismu neuronů, konkrétně v potlačení účinků oxidativního stresu. U zmíněných procesů je důležitým mechanismem aktivace

jaderného transkripčního faktoru NF- κ B, který hraje významnou roli v transkripci genů zapojených v imunitní a zánětlivé odpovědi a také v antioxidantním procesu (Barros *et al.*, 2014).

Nedostatek n-3 PUFA, především DHA, je v současné době spojován s poklesem kognitivních funkcí i u starších pacientů, zvláště s rozvojem Alzheimerovy choroby. Předpokládá se, že je to způsobeno ovlivněním regulace příjmu glukózy mozkovou tkání prostřednictvím změny aktivity některých přenašečů glukózy (Freemantle *et al.*, 2006).

Jedna ze dvou oblastí lidského mozku, kde v dospělosti probíhá neurogeneze, je hippocampus. Tato část mozku ovlivňuje kognitivní funkce a náladu, její vystavení n-3 PUFA (DHA a EPA) vedlo ke zvýšení synaptické plasticity (jedná se o specifickou změnu v účinnosti přenosu informace), tvorbě nových dendritických trnů a zlepšení kognitivních a behaviorálních funkcí (Lukiw a Bazan, 2008).

2.1.5.3 Vliv na nádorová onemocnění

Mezi rizikové faktory, které mohou vést k rozvoji rakovinového bujení, řadíme genetické mutace, epigenetické změny, chronické záněty, výživu a životní styl. Epidemiologické studie a studie na pokusných zvířecích modelech dokládají, že výživa s vysokým obsahem tuků může být spojena se zvýšeným rizikem rozvoje rakoviny tlustého střeva, konečníku, prsu a prostaty (Woutersen *et al.*, 1999).

Bylo navrženo několik možných mechanismů, kterými n-3 PUFA potlačují rozvoj rakoviny, studie však nejsou příliš konzistentní a nabízí se další možnost zkoumání v této oblasti. Mezi tyto mechanismy můžeme zařadit potlačení syntézy eikosanoidů z LA, ovlivnění některých transkripčních faktorů, genové exprese, modulaci signálních drah, změny v metabolismu estrogenu, ovlivnění produkce volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, citlivosti k inzulínu a ovlivňování fluidity membrány (Larsson, 2004). Touvier *et al.* (2012) došli ve své studii k závěru, že příjem n-3 PUFA potlačuje prokarcinogenní účinky sICAM-1, což je imunoglobulin patřící k adhezním molekulám. Syntéza sICAM-1 je indukována prozánětlivými cytokiny a zvýšená hladina sICAM-1 byla detekována u velkého množství pacientů s různými druhy rakoviny. Byla prokázána souvislost mezi příjmem n-3 PUFA a lepší snášenlivostí podávaných chemoterapeutik u rakoviny tlustého střeva a konečníku. DHA je také podávána jako podpůrná léčba u rakoviny prsu, u níž je předpokládáno, že zvyšuje procento přežívajících pacientů.

Mechanismus působení pravděpodobně zahrnuje snížení produkce prostaglandinů 2. třídy a syntézu protizánětlivých resolvinů. Naopak metabolity n-6 PUFA, například prostaglandiny 2. třídy, jsou spojeny se vznikem a rozvojem rakoviny tlustého střeva a konečníku (Cockbain *et al.*, 2012).

Byla prokázána antineoplastická aktivita metabolitů n-3 PUFA související s potlačením přeměny somatických buněk na buňky nádorové. Mezi hlavní antineoplastické mechanismy patří úprava COX aktivity, modulace některých receptorů, membránové dynamiky a snížení oxidativního stresu (Fetterman a Zdanowicz, 2009).

2.1.5.4 Vliv na zánět a imunitu

Imunitní systém zahrnuje celou řadu mechanismů, které poskytují organizmu ochranu před patogenními vlivy, jak z vnějšího, tak z vnitřního prostředí. Zahrnuje mnoho interakcí rozmanitých typů buněk po celém těle. Mezi hlavní mechanismy imunitní odpovědi řadíme fagocytózu, tvorbu antigenů a aktivaci T-lymfocytů, které zprostředkovávají množení a produkci cytokinů stimulujících buňky (například k produkci protilátek, zánětlivé odpovědi atd.). Zánětlivá odpověď je soubor reakcí projevující se následkem místního poškození, infekce či imunologické stimulace. Nesprávná aktivace imunitního systému, například zánětlivé odpovědi je charakteristická pro mnoho běžných nemocí. Imunitní systém zahrnuje dva základní typy: vrozenou a získanou imunitu.

Vrozená imunita je základní bariérou proti infekčním částicím, je nespecifická a funguje již před setkáním s daným patogenem. Hlavními složkami vrozené imunity jsou fyzické bariéry (kůže a slizniční povrchy), fyziologické bariéry (teplota, pH), komplement, granulocyty a makrofágy. Oproti tomu získaná imunita je založena na vysoké specifitě, její hlavní složkou jsou lymfocyty, které nesou specifické povrchové receptory pro každý antigen. Po vniknutí patogenu do organizmu není odpověď okamžitá, může trvat i několik dní, poté však vzniká imunologická paměť, která vede k rychlejší, silnější a účinnější reakci při dalším setkání s daným patogenem.

Získaná imunita je spojena s tvorbou protilátek produkovaných B-lymfocyty ve formě imunoglobulinů, které zprostředkovávají látkovou imunitu. Naopak T-lymfocyty napadenou buňku buď zabijí, nebo stimulují jiné buňky k posílení imunitní reakce a zprostředkovávají tak buněčnou imunitu. T-lymfocyty jsou specializovány

k rozpoznávání intracelulárních antigenů, které jsou pro B-lymfocyty neviditelné, ale nejsou schopny reagovat s antigenem přímo, vyžadují přítomnost antigen prezentujících buněk (například makrofágy, dendritické buňky, B-lymfocyty). T a B-lymfocyty se vzájemně ovlivňují prostřednictvím cytokinů.

Mastné kyseliny zastupují v imunitním systému řadu funkcí: jsou složkami fosfolipidů modulujících fyzikální a funkční vlastnosti membrán, upravují strukturu proteinů, regulují genovou expresi a jsou prekurzory pro tvorbu eikosanoidů. Lidské imunitní buňky jsou bohaté na arachidonovou kyselinu, její obsah může být regulován pomocí diety bohaté na EPA a DHA. To pak vede k produkci eikosanoidů jiných tříd a zvýšené produkci dokosanoidů a resolvinů. Tato změna ovlivňuje fagocytózu, signalizaci T-lymfocytů a schopnost prezentace antigenů (Calder, 2007).

PUFA rodiny n-3 ovlivňují produkci adhezních molekul na povrchu buněk, které mají vliv na interakci mezi leukocyty a buňkami endotelu, což ovlivňuje vstup leukocytů do místa zánětu (Calder, 2006). Studie prováděné na kulturách buněk ukazují, že EPA a DHA snižují u monocytů produkci prozánětlivého cytokinu tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukinu 1 β (IL-1 β) a transformujícího růstového faktoru beta 1 (TGF- β 1; Zhao *et al.*, 2004; Novak *et al.*, 2003), a také produkci IL-6 a IL-8 u endoteliálních buněk cév. TNF- α je proteinový homotrimer a skládá se tedy ze tří identických podjednotek, vyskytuje se v transmembránové a sekretované formě. Obě formy se účastní imunitních reakcí (iniciace a regulace) prostřednictvím vazby na receptory - TNFR1 a TNFR2 a následnou aktivací intracelulárních kaskád (Chýlková *et al.*, 2010). Tyto kaskády mají dva rozdílné následky, a to indukci apoptózy nebo expresi dalších genů. TNF- α se podílí na průběhu srážení krve, rozpouštění sraženin, ovlivňuje inzulinovou rezistenci a endoteliální funkce. Špatná regulace sekrece TNF- α má závažné fyziologické dopady. Snížená sekrece nebo jeho úplná nepřítomnost může vést k selhání obranných mechanismů a potlačení imunitní reakce, naopak nadměrná produkce je spojována s manifestací autoimunitních nemocí. Výzkumy navrhuje, že n-3 PUFA ovlivňují genovou expresi zánětlivých faktorů skrze snížení aktivity některých transkripčních faktorů, například jaderného faktoru kappa B (NF- κ B). EPA snížila u kultivovaných pankreatických buněk aktivaci NF- κ B zapříčiněnou TNF- α (Ross *et al.*, 1999). Podobné pokusy byly provedeny také na kultivovaných lidských monocytech a došly ke stejným závěrům. Dále bylo pozorováno snížení fosforylace I κ B, což je

přirozený inhibitor NF- κ B, který zabraňuje jeho translokaci do jádra (Novak *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004).

Jak bylo zmíněno výše, vlivem n-3 PUFA dochází také ke snížení produkce IL-6, IL-8 a IL-1 β . Interleukin-8 patří mezi cytokiny produkované fagocyty a buňkami mezenchymu vystavených zánětlivému podnětu, působí chemotakticky a je pravděpodobnou příčinou místního hromadění neutrofilů. IL-6 je cytokin, který působí prozánětlivě, zprostředkovává akutní fázi zánětu a zvyšuje sekreci protilátek. IL-1 β také patří mezi prozánětlivé cytokiny, je exprimován monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami jako odpověď na zánětlivý stimul. V první řadě je syntetizována jeho inaktivní forma, která zůstává v cytoplazmě a čeká na maturaci, ke které je třeba proteinového oligomeru – inflamazomu, který dále aktivuje zánětlivou kaskádu.

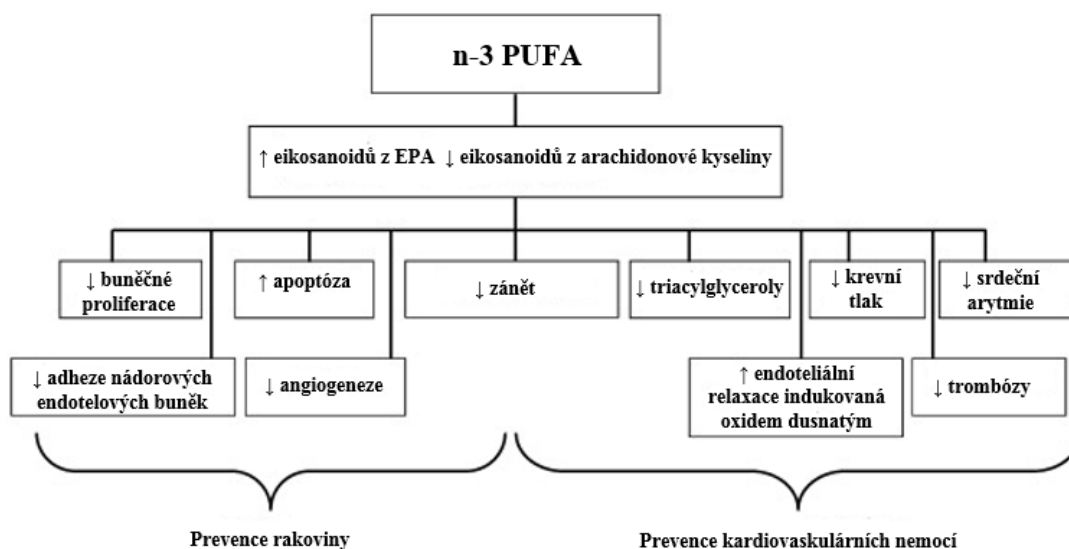
Dalšími látkami, které významně ovlivňují imunitní systém a zánětlivý proces, jsou transformující růstový faktor β 1 a IL-10. TGF- β 1 byl u lidí objeven jako první z rodiny TGF- β , a to u krevních destiček. Je produkován především buňkami mezenchymu a podílí se na regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy. Dále je nepostradatelný při hojení ran, díky vlivu na proliferaci buněk fibroblastů a myofibroblastů, čímž se významně podílí na tvorbě kolagenového zajištění (Alberts *et al.*, 2008). TGF- β 1 vykazuje důležitou regulační aktivitu také v imunitním systému, je sekretován T-buňkami a potlačuje funkci dalších T-buněk, například cytotoxických či pomocných. Působení TGF- β 1 na makrofágy a monocyty je především inhibiční, ovlivňuje proliferaci a předchází produkci kyslíkových radikálů a meziproductů dusíku (například oxidu dusnatého). Avšak TGF- β 1 má v některých případech na myeloidní buňky i opačný efekt, například může fungovat jako chemoatraktant a iniciovat imunitní reakci. Za normálních fyziologických podmínek také potlačuje produkci některých cytokinů (interferon- γ , TNF- α) a interleukinů. Zvýšený příjem n-6 PUFA a cholesterolu vede k nadměrné aktivaci TGF- β 1, což způsobuje zánětlivý proces a má podíl na progresi některých typů rakovinového bujení, například nádorových lézí zažívacího traktu (Biasi *et al.*, 2008).

IL-10 je protizánětlivý cytokin a vykazuje podobný účinek na T-buňky jako TGF- β 1, inhibuje účinky některých cytokinů (IL-2, -3, -4, -5, -6, -8, TNF- α) a tlumí buněčnou imunitu. IL-10 chrání organismus před nepřiměřeným rozvojem imunitní odpovědi, naopak jeho nadměrná exprese může vést k nekontrolovanému šíření patogenů. Dále působí na diferenciaci aktivovaných B-lymfocytů na plazmatické buňky. V některých případech IL-10 vykazuje i prozánětlivé účinky, například aktivací B-lymfocytů

a stimulací produkce autoprotilátek. V současné době je využíván k léčebným účelům, například u Crohnovy choroby, jelikož je významným regulátorem imunity ve střevě. Výzkumy ukazují, že n-3 PUFA zvyšují hladinu IL-10 (Zeitlin, 2003).

Obecně tedy PUFA rodiny n-3 snižují produkci zánětlivých eikosanoidů, cytokinů a adhezních molekul pomocí vytěsnění kyseliny arachidonové jako substrátu pro tvorbu eikosanoidů, syntézy protizánětlivých resolvinů a ovlivněním transkripčních faktorů.

V předchozích kapitolách bylo zmíněno působení n-3 PUFA na lidský organizmus, které je také shrnuto na obr. 3.



Obr. 3: Mechanismus působení n-3 PUFA jako prevence rakoviny a kardiovaskulárních nemocí; ↑ = zvýšení a ↓ = snížení exprese nebo hladiny (převzato a upraveno z Manson et al., 2012).

2.2 Modulace genové exprese vlivem PUFA

Mastné kyseliny regulují expresi genů zapojených do energetického metabolismu a metabolismu tuků. PUFA rodiny n-3 i n-6 mohou významně ovlivňovat dráhy přenosu signálů, které zprostředkovávají komunikaci mezi membránovými receptory a aktivací transkripčních faktorů. PUFA mohou působit na následující transkripční faktory (Žák et al., 2005):

- Receptory aktivované peroxizomálními proliferátory (*peroxisome proliferator activated receptors*, PPAR),

- Jaterní X receptory (*liver X receptors*, LXR),
- Jaterní nukleární faktor-4 α (*hepatocyte nuclear factor*, HNF-4 α),
- Transkripční faktor SREBP-1 a -2 (*sterol regulatory element-binding protein*),
- Receptor 120 spřažený s G-proteinem (*G-protein coupled receptor 120*, GPR120),
- AdipoR (*Adiponectin receptor*),
- Transkripční faktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

2.2.1 PPAR

Název jaderných receptorů PPAR je dán historicky, jelikož byly objeveny při výzkumu zaměřeném na identifikaci genů exprimujících látky, které ovlivňují proliferaci peroxizomů. Peroxizomy jsou buněčné organely umožňující β -oxidaci dlouhých a rozvětvených mastných kyselin, dále se podílejí na syntéze cholesterolu, žlučových kyselin a strukturních lipidů. Rozlišujeme tři izotypy PPAR – α , γ , δ (někdy označován β), které jsou exprimovány v různých tkáních a mají rozmanité účinky. Zatímco PPAR- δ můžeme nalézt takřka ve všech tkáních, PPAR- α je produkován především v játrech a svalech a izotyp γ pak převážně v tukové tkáni (Šmahelová, 2005). Ligandy PPAR jsou obecně látky lipofilní povahy – mastné kyseliny a jejich deriváty, eikosanoidy, prostaglandiny a také některá farmaceutika (např. fibráty).

PPAR- α se účastní regulace exprese genů ovlivňujících β -oxidaci mastných kyselin (také α - a ω -), proteinů zapojených v aterogenezi, zánětu cév a vzniku trombóz. PPAR- α působí jako hlavní složka udržující energetickou homeostázu, což se projevuje především u hladovění, kdy je klíčovým pro metabolickou adaptaci. Dále se podílí na transportu mastných kyselin do mitochondrií regulací aktivity karnitin-palmitoyltransferázy I a II, která zprostředkovává přechod mastných kyselin z cytosolu (Haluzík a Svačina, 2005). Hlavními endogenními ligandy PPAR- α jsou různé typy volných mastných kyselin. PPAR- α je produkován buňkami imunitního systému, například makrofágy, dendritickými buňkami, B a T-lymfocyty. U celé řady agonistů (tedy látek s aktivačním účinkem) PPAR- α byl prokázán protizánětlivý a protisrážlivý efekt, potlačují tvorbu IL-2, TNF- α a IFN- γ (interferon produkováný aktivovanými T-lymfocyty) a indukují syntézu IL-4 (Han *et al.*, 2005), což působí antiaterogenně. Agonisté PPAR- α se také podílejí na

průběhu zánětu ovlivněním exprese negativního regulátoru I κ B- α , který inhibuje translokaci a aktivaci NF- κ B (Jones *et al.*, 2002). U fibrátů, agonistů PPAR- α , byl prokázán vliv na zvýšení inzulínové senzitivity a celkový pozitivní dopad na metabolismus. Také byl popsán vliv PPAR- α na antioxidační proces prostřednictvím regulace enzymu superoxiddismutázy zodpovědné za neutralizaci volných kyslíkových radikálů. Exprese mRNA pro PPAR- α je výrazně vyšší u hlodavců než u lidí (především v játrech), což mohlo vést k neprůkaznému výsledku při podávání fibrátů účastníkům klinické studie (Haluzík a Svačina, 2005).

PPAR- δ má klíčovou roli v diferenciaci buněk a tkání a využití tuků, jeho exprese probíhá od raných stádií embryogeneze. PPAR- δ vytváří heterodimer s retinoidním nukleárním receptorem X (RXR), čímž vzniká funkční komplex. Tento receptor je aktivován širokým spektrem ligandů, například nasycenými a nenasycenými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem a prostacykliny. Byly identifikovány také syntetické ligandy PPAR- δ , například deriváty kyseliny fenoxyoctové (Sznajdman *et al.*, 2003). Poruchy receptoru δ jsou v časných stádiích vývoje ve většině případů letální, jelikož vedou k defektům placenty (Peters *et al.*, 2000). PPAR- δ stimuluje tvorbu preadipocytů a má vliv na indukci PPAR- γ , který podněcuje adipogenezi. Také bylo zjištěno, že v průběhu zánětu je v keratinocytech zvýšená exprese PPAR- δ jako odpověď na vysokou hladinu TNF- α , což zvyšuje rezistenci buněk k apoptóze indukované TNF- α a jejich diferenciaci (Michalik *et al.*, 2003). PPAR- δ dále hraje významnou roli ve vstřebávání tuků, jejich oxidaci a využití v kosterních svalech, dále ve fyziologii střev a předpokládá se, jeho zapojení v rozvoji střevních nádorů. V kosterním svalstvu působí jako regulátor katabolizmu tuků, především při zvýšené fyzické zátěži či dlouhodobém hladovění, kdy zrychluje jejich spalování. Zvýšená spotřeba mastných kyselin ve svalech a adipocytech zlepšuje inzulínovou senzitivitu omezením dostupnosti substrátu pro syntézu triacylglycerolů a potlačením jejich následné akumulace v játrech, svalech a tukové tkáni. Snížení hromadění lipidů v adipocytech může také napomoci ustálit produkci adipocytokinů (např. adiponektinu), čímž je podporováno zvýšení oxidace mastných kyselin v játrech a ve svalech (Luquet *et al.*, 2005).

PPAR- γ byl objeven při klonování DNA záby *Xenopus* již roku 1992, v tomtéž roce byl identifikován i u člověka (Rosen a Spiegelman, 2001). PPAR- γ má tři transkripční izoformy γ 1, γ 2 a γ 3, rozdíl mezi nimi je jen nepatrný, ale mají velmi rozmanitou distribuci. Zatímco PPAR- γ 1 nalézáme v mnoha tkáních, exprese izoformy γ 2 je omezena

převážně na bílou tukovou tkáň a γ pouze na tlusté střevo a tukovou tkáň (Haluzík a Svačina, 2005). PPAR- γ významně ovlivňuje adipogenezi, ke které je nutný koaktivátor PGC-1 α . Mezi ligandy PPAR- γ řadíme PUFA – kyselinu linolenovou, arachidonovou a eikosapentaenovou a některé jejich metabolity (například 9-hydroxyoctadecadienové kyseliny). Izoforma γ je spojována se zvýšením inzulínové senzitivity, a to díky účinkům na tukovou, svalovou a jaterní tkáň. V tukové tkáni dochází působením PPAR- γ k remodelaci a diferenciaci nových adipocytů (to vede k převaze „malých“ adipocytů nad „velkými“), ovlivňují v nich genovou expresi a sekreci adipocytárních hormonů a také snižují množství cirkulujících mastných kyselin zvýšením jejich ukládání. „Malé“ adipocyty vykazují vyšší produkci adiponektinu (hormon s inzulín-senzitivujícím účinkem) a nižší uvolňování hormonů opačného účinku (např. TNF- α). Adiponektin je produkován výhradně tukovou tkání a jeho sérová koncentrace klesá s rostoucím množstvím tukové tkáně (Weyer *et al.*, 2001). Výzkum Haluzíka *et al.* (2004) ukazuje na přímý vztah adiponektinu k inzulínové rezistenci. Hladina TNF- α je u pacientů trpících obezitou zvýšená, jak v séru, tak v tukové tkáni, což vede ke zvýšení hladiny triacylglycerolů. U svalové tkáně adiponektin zvyšuje senzitivitu na inzulín, jak přímo svou aktivací, tak nepřímo redistribucí svalových lipidů do tukové tkáně. V játrech také působí zvýšenou inzulínovou senzitivitu svou aktivací, regulací ukládání lipidů a redistribucí lipidů z jater do tukové tkáně. Autoři Han *et al.* (2014) ve své studii buněk glomerulu u potkanů prokázali, že EPA i DHA významně zvyšují expresi PPAR- γ , což na buňky působilo protizánětlivě, také díky potlačení syntézy prozánětlivých kináz. Mejía-Barradas *et al.* (2014) ve své studii prokázali sníženou expresi mRNA u genů kódujících PPAR- γ a PGC-1 α , která byla podmíněna 12 týdenní dietou s vysokým obsahem n-3 PUFA, což vedlo k závěrům, že n-3 PUFA potlačují adipogenezi v podkožním tuku.

2.2.2 LXR a HNF

Jaterní nukleární receptory X (LXR) se významnou měrou podílejí na řízení metabolismu cholesterolu a jeho následném přenosu z tkání do jater. Byly identifikovány dvě izoformy – α a β , LXR- α je hojně exprimován v játrech, zatímco LXR- β je produkován takřka všemi tkáněmi. Přírodními ligandy LXR jsou oxysteroly (metabolity cholesterolu). Dalším transkripčním faktorem, který ovlivňuje n-3 a n-6 PUFA, je jaterní

nukleární faktor-4 α (HNF-4 α), který je nepostradatelný pro řízení exprese genů v játrech a slinivce a také je důležitou součástí metabolismu lipidů. Výzkum Hayhursta *et al.* (2001) prokázal, že HNF-4 α hraje důležitou roli v diferenciaci hepatocytů. Také bylo u knock-outovaných myší pozorováno výrazné hromadění lipidů v jaterní tkáni a značně snížená hladina sérového cholesterolu, triacylglycerolů a zvýšená hladina žlučových kyselin, což ukazuje na výrazný vliv HNF-4 α na homeostázu lipidů.

2.2.3 SREBP

Transkripční faktory SREBP jsou senzory intracelulárních přeměn lipidů a jsou součástí syntézy cholesterolu (SREBP-1a, SREBP-2), mastných kyselin a triacylglycerolů (SREBP-1c). SREBP-1c náleží mezi geny působící na metabolismus lipidů a citlivost k inzulinu, jeho nadměrná exprese může mimo jiné vést k závažné rezistenci k inzulinu, což vede k rozvoji *diabetu mellitu* II. typu. Všechny SREBP vznikají jako inaktivní prekurzor, který je v endoplazmatickém retikulu vázán na SCAP (SREBP *cleavage-activating protein*) a tento komplex je ukotven pomocí Insig proteinů. Pokud je nedostatek sterolů, dochází k disociaci komplexu z Insig proteinů a jeho vezikulárnímu transportu do Golgiho aparátu, kde dochází k aktivaci SREBP (Yang *et al.*, 2002). Tato aktivní forma SREBP se poté váže na mnoho rozličných promotorů genů účastnících se lipidového metabolismu. Deckelbaum *et al.* (2006) prokázali, že PUFA významně snižují hladinu aktivní formy SREBP, výrazně vyšší inhibiční účinek vykazuje především EPA, DHA a arachidonová kyselina, naopak PUFA s kratším řetězcem mají účinek nižší. Dalším mechanismem, který zapříčiňuje snížení hladiny aktivního SREBP, je působení PUFA na složení buněčných membrán. PUFA zvyšují hydrolýzu sfingomyelinu na ceramid, který má nižší afinitu k volnému cholesterolu než sfingomyelin. Zvýšený příjem n-3 PUFA působí zvýšení degradace mRNA SREBP (Xu *et al.*, 2002).

2.2.4 GPR120

U receptoru 120 spřaženého s G-proteinem (GPR120) bylo prokázáno, že funguje jako receptor/senzor pro n-3 PUFA. Oh *et al.* (2010) ve svém výzkumu použili dvě skupiny obézních myší, jednu skupinu *wild-type* a druhou, u které byl proveden knock-out GPR120. Tyto myši byly krmeny dietou s vysokým obsahem tuků s přidavkem nebo bez

přídavku n-3 PUFA. PUFA n-3 potlačily zánět a zvýšily senzitivitu k inzulinu u *wild-type* myši, avšak u myši s knock-outem GPR120 neměly žádný účinek. Výsledky potvrzují, že GPR120 na buněčném povrchu makrofágů a adipocytů vedou ke zvýšení senzitivity k inzulinu potlačením zánětu indukovaného makrofágy. Zánětlivá kaskáda vyžaduje aktivaci TAK1, který fosforyluje I κ B, což vede k aktivaci NF- κ B a následné transkripci prozánětlivých cytokinů. Vazba EPA a DHA na GPR120 zabraňuje aktivaci TAK1, čímž potlačuje prozánětlivou kaskádu, předpokládá se proto, že EPA a DHA by mohly vést ke zlepšení zánětlivých onemocnění. Stejný účinek byl také prokázán u buněk hypotalamu a u neuronů exprimujících neuropeptid Y (NPY). Neuropeptid Y je látka charakteru neurotransmiteru a působí na zvýšení chuti k jídlu a snížení energetického výdeje, je tedy antagonistou leptinu. U obezity vyvolané dietou se buňky hypotalamu stávají odolnými vůči působení leptinu. Studie navrhuje, že vazba PUFA na GPR120 neuronů exprimujících NPY vede k obnovení účinku leptinu na buňky hypotalamu (Cintra *et al.*, 2012).

2.2.5 AdipoR

Adiponektin můžeme v těle nalézt ve dvou formách – v plné délce a po proteolytickém štěpení v globulární formě. Globulární forma se váže především na receptory v kosterním svalstvu a naopak se méně váže na receptory v jaterní tkáni. Adiponektin produkovaný adipocyty se váže na receptor AdipoR a vede k redukci množství ceramidů a inhibuje účinek NF- κ B prostřednictvím protein kinázy aktivované monofosfáty (AMPK). Adiponektin působí zejména v kosterním svalstvu (AdipoR-1) a v játrech (AdipoR-2), kde snižuje hladinu tryacylglycerolů (Silbernagl a Lang, 2010). Mezi jeho další účinky patří snížení glukoneogeneze v játrech, což vede ke snížení glykémie, dále zvyšuje oxidaci tuků ve svalech. Adiponektin je nutný ke zvýšení senzitivity k inzulinu zprostředkovanou agonisty PPAR- γ a indukuje influx Ca²⁺ nutný ke správnému fungování protein kináz závislých na kalmodulinu a Ca²⁺. Dále prostřednictvím vazby na receptor AdipoR-2 aktivuje a zvyšuje expresi ligandů PPAR- α a zvyšuje spalování mastných kyselin a spotřebu energie (Yamauchi, 2007).

2.2.6 NF- κ B

NF- κ B je rodina vysoce konzervovaných transkripčních faktorů, své jméno dostaly díky funkci v regulaci exprese κ -řetězce imunoglobulinů. Do rodiny NF- κ B patří pět proteinů dvou tříd: NF- κ B1, NF- κ B2 (třída I) a RelA, RelB, cRel (třída II), které se váží na promotory RNA polymerázy II. Jedná se o proteiny, které jsou zjednodušeně řečeno zodpovědné za produkci některých cytokinů a přežití buněk. NF- κ B je zapojen do imunitní reakce, apoptózy, karcinogeneze a zánětlivé odpovědi. Podílí se na rychlé odpovědi na virové a bakteriální infekce, smykové napětí (ovlivňuje expresi u buněk cévního endotelu, má pro-aterogenní účinek), oxidační stres a na produkci rozmanitých cytokinů (Dąbek *et al.*, 2010). Aktivace NF- κ B vede ke zvýšení produkce cytokinů, regulátorů růstu, imunomodulačních molekul a genů účastnících se apoptózy. Naopak příliš dlouhá aktivace působí na organismus negativně, byla popsána u autoimunních onemocnění, rakoviny a aterosklerózy (Ghosh a Hayden, 2008).

NF- κ B je aktivován velkým množstvím molekul, například virovými a bakteriálními antigeny, IL-1 β , TNF- α , interferonem γ , některými růstovými faktory a také fyzikálními činiteli (tepelný šok, UV, radiace) atd. Před aktivací je NF- κ B v cytoplazmě vázán na I κ B, který maskuje jaderný lokalizační signál, po fosforylaci I κ B je NF- κ B translokován do jádra. Bylo prokázáno, že PUFA vedou ke snížení exprese zánětlivých cytokinů (TNF α , IL-1 β , IL-6) a enzymů a také mohou ovlivňovat produkci adhezních molekul (Walloschke *et al.*, 2010). Výzkum Schumanna a Fuhrmanna (2010) prokázal vliv PUFA na snížení aktivity NF- κ B prostřednictvím aktivace PPAR a modulace složení buněčné membrány. Také navrhuje, že rozdílné působení n-3 a n-6 PUFA není způsobeno přímým působením na transkripční faktory, ale produkcí odlišných tříd eikosanoidů. Potlačení aktivity NF- κ B může mít prospěšný dopad na řadu zánětlivých onemocnění a také na rakovinu. Konzumace n-3 PUFA je spojena se sníženou fosforylací I κ B a tedy i aktivací NF- κ B (Novak *et al.*, 2003).

2.3 Obecné principy použitých metod

2.3.1 Real-time PCR (qRT-PCR)

Real-time PCR (PCR v reálném čase) je metoda umožňující kvantifikaci PCR produktu v průběhu jednotlivých cyklů amplifikační reakce a je používána například ke studiu exprese či ke stanovení některých patogenů. Obecně spočívá v izolaci RNA ze vzorku, následné reverzní transkripci do komplementární DNA (cDNA), která je použita jako templát pro PCR reakci využívající fluorescenční značení. Oproti klasické PCR poskytuje qRT-PCR řadu výhod – je rychlejší, citlivější a lze jí analyzovat velké množství vzorků najednou. Hlavní nevýhodou je vysoká pořizovací cena potřebných přístrojů.

K fluorescenčnímu značení se využívají specifické a nespecifické sondy. Mezi nespecifické můžeme zařadit kyaninová barviva SYBR Green, BEBO či ethidiumbromid, které se váží do menšího žlábků dsDNA nebo interkalují. SYBR Green je nejpoužívanější sondou díky nízké ceně a možnosti využití pro takřka jakýkoliv DNA templát, jeho nevýhodou jsou však možné nepřesnosti (například vazba na dimery primerů). Ke specifickým sondám patří hydrolyzační sondy TaqMan, hybridizační FRET sondy, molekulární majáky a škorpión sondy. Nejčastěji jsou využívány sondy TaqMan, které mají na svém 5'-konci fluorescenční značku a na 3'-konci zhášec, Hydrolyzou sondy DNA-polymerázou je zhášec oddělen od fluoroforu a je emitován fluorescenční signál (Hrstka *et al.*, 2014).

Během amplifikace se exponenciálně zvyšuje množství produktu, na který se váže barvivo a tím dochází ke stále intenzivnější emisi fluorescenčního záření. Tento signál je nejvyšší na konci exponenciální fáze, poté dochází ke zpomalování reakce díky spotřebě jednotlivých složek reakce. Ve třetí fázi je reakce zastavena a může docházet k degradaci produktu. Exponenciální fáze začíná v takzvané prahové hodnotě C_T , která udává počet cyklů, kdy fluorescenční signál překoná šum pozadí. Čím vyšší je počáteční množství produktu, tím nižší je hodnota C_T (Dudová a Hájek, 2008).

K vyhodnocení se v praxi nejčastěji používá absolutní a relativní kvantifikace. Pomocí absolutní metody vyhodnocení zjistíme přesné množství kopií templátu ve vzorku vzhledem k celkovému množství standardu. Relativní kvantifikace vypovídá o změně exprese sledovaného genu vzhledem ke standardu. Jako standard jsou používané house-keepingové geny (například β -aktin), jejichž exprese je konstantní. Mezi

používané výpočtové metody patří metoda standardních křivek a komparativní C_T metoda (Hrstka *et al.*, 2014).

2.3.2 ELISA

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) patří mezi imunochemické metody umožňující kvantitativní stanovení antigenů nebo protilátek. Všechny varianty této metody jsou založeny na vysoce specifické vazbě antigenu a protilátky, u stanovení je na jednu z komponent navázán enzym (peroxidáza, alkalická fosfatáza), který katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na barevný produkt. Následné stanovení se provádí spektrofotometricky, popřípadě na základě fluorescence, kdy je koncentrace produktu úměrná koncentraci antigenu či protilátky ve vzorku. ELISA metoda je vysoce specifická a používá se ke stanovení mikroorganismů, proteinů či toxinů.

V komerčně dostupných kitech je nejčastěji využívána nekompetitivní sendvičová ELISA, kdy je detekovaný antigen navázán na dvě protilátky, z nichž jedna ukotvena na dně jamky (zkumavky, magnetické částice) a druhá je enzymaticky značená. ELISA má mnoho modifikací – přímá (nejjednodušší stanovení pomocí značené protilátky), nepřímá (využívá sekundární značené protilátky) a kompetitivní (neznačený analyt ve vzorku soutěží o vazebná místa se značeným analytem, čím menší je konečný signál, tím vyšší je koncentrace analytu).

2.3.3 Western-blotting

Western-blotting slouží k imunologické detekci bílkovin prostřednictvím protilátek a obvykle jí předchází separace pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy. Poté je výsledný gel přenesen na membránu, to může probíhat pomocí elektrického pole nebo pasivním přenosem difúzí. Následuje vizualizace proteinů na membráně, před níž je nutné blokovat volná vazebná místa na membráně. K barvení můžeme využít nespecifická barviva (stříbro, Coomassie Brilliant Blue) barvicí všechny proteiny, jelikož je však proteinů velké množství a na gelu se nezdědí překrývají, je interpretace takto získaných výsledků složitá. Tento problém řeší použití denaturační polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE), při níž jsou proteiny denaturovány laurylsíranem sodným (SDS). Při této metodě dochází k rozpadu komplexů proteinů, každý protein je obklopen molekulami

SDS a při jejich separaci tak rozhoduje pouze molekulová hmotnost, nikoliv náboj či konformace (Šmarda *et al.*, 2005). Proteiny separované pomocí SDS-PAGE lze taktéž zviditelnit nespecificky, nebo je možné využít protilátky ke specifické vizualizaci. Po přenesení na nitrocelulóзовou membránu, kde jsou proteiny imobilizovány, je membrána promývána v roztoku protilátky a po odstranění nenavázaných protilátek je detekována značenou sekundární protilátkou (enzymaticky nebo radioaktivně). Tento komplex je zviditelněn katalytickou barevnou reakcí nebo autoradiograficky, přičemž tloušťka proužku vypovídá o množství daného proteinu.

2.3.4 Stanovení mastných kyselin

Ke stanovení mastných kyselin je nejčastěji využívána plynová chromatografie, před samotnou analýzou je však třeba vzorky odvodnit, extrahovat a následně derivatizovat. Extrakce je nutná k uvolnění tuku z vazeb na bílkoviny a sacharidy. Existuje hned několik postupů extrakce – varem v rozpouštědle a následným promýváním, v uzavřené nádobě v nadbytku rozpouštědla, pomocí par rozpouštědla v extrakční patroně a další. Jejich využití se liší podle složení analyzovaného vzorku/tkáně. Dalším krokem je derivatizace sloužící k převedení mastných kyselin na metylestery (popřípadě butylestery u kratších mastných kyselin). Metylestery mastných kyselin se vyznačují vyšší těkavostí, což je při stanovení plynovou chromatografií žádoucí. Po derivatizaci se provádí samotná plynová chromatografie.

Plynová chromatografie patří mezi fyzikálně-chemické separační metody a jejím základem je rovnováha analyzované látky mezi dvěma fázemi (pohyblivé a nepohyblivé). Při analýze jsou složky vzorku unášeny pohyblivou fází (nosný plyn) a interagují s fází nepohyblivou. Jednotlivé složky jsou oddělovány na základě různé afinity k nepohyblivé části umístěné v koloně. Pokud kolonu složka opustí, detektor zaznamená signál, který je následně vyhodnocen. Druh a kvantitativní zastoupení složek je poté určeno na základě intenzity signálu a časového průběhu.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- Zpracovat literární rešerši současných poznatků týkajících se kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) na ukazatele zánětu v organismu člověka a laboratorního potkana. Dále prostudovat působení EPA a DHA na expresi genů pro transkripční faktory, u kterých je předpokládána modulace jejich signálních drah (jaderný faktor NF- κ B a receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů PPAR- γ).
- Podílela jsem se na zajištění chovu potkanů, přípravě krmiv, odběru vzorků tkání, kvantifikaci exprese uvedených genů a na imunochemickém stanovení plazmatických hladin vybraných cytokinů. Avšak mé hlavní zaměření bylo stanovení množství adiponektinu, PPAR- γ a NF- κ B ve tkáních pomocí Western-blotu, kterému se také ve výsledcích věnuji nejvíce. Ve své práci zmiňuji i další použité metody a jimi získané výsledky, jelikož pouze mé výsledky by vytrženy z kontextu postrádaly smysl.
- Získané výsledky zanalyzovat pomocí vhodných statistických metod a následně zpracovat ve formě diplomové práce.
- Pomocí experimentu a následných laboratorních testů ověřit předpokládaný vliv kyseliny dokosahexaenové na potlačení a v dlouhodobém horizontu také na zabránění navození mírného chronického zánětu organismu.
- Srovnat působení kyseliny dokosahexaenové a linolové na zánětlivý stav pokusných zvířat.
- Otestovat hypotézu, že kyselina dokosahexaenová je v potlačení zánětu efektivnější než kyselina eikosapentaenová.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Pokusná zvířata, chovné podmínky a odběr tkání

Studie byla prováděna na čtyřiceti dospělých potkaních samcích outbredního kmene Wistar albino. Potkani pocházeli z chovu společnosti BioTest s.r.o. (Konárovice) a byli na začátku pokusu ve věku deseti týdnů. Počáteční hmotnost potkanů se pohybovala kolem $293,9 \pm 30$ g a na jejím základě byli rozděleni do čtyř hmotnostně vyvážených skupin. Každý potkan byl označen, aby byla možná jasná identifikace. Zvířata byla chována v plastových boxech ($53,5 \times 32,5 \times 30,5$ cm) za standardních laboratorních podmínek (teplota v místnosti byla 23 ± 1 °C, vlhkost 60 %), s řízeným denním režimem 12 hodin světlo/12 hodin tma, přičemž maximální intenzita osvětlení dosahovala 200 luxů. Experiment probíhal v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů č. 162/1993 Sb.

Potkani byli každý týden váženi a každý den bylo zaznamenáváno množství podávaného a zkonsumovaného krmiva. Všichni potkani byli po dobu sedmi týdnů krmeni směsí s vysokým obsahem tuků a cukrů, v níž byl kromě kompletní krmné směsi pro myši a potkany (MYPO) od firmy Biokron (Blučina) obsažen hovězí lůj, slazené kondenzované mléko a premix vitamínů a minerálů (dále dieta T). U této diety jsme předpokládali, že u potkanů způsobí obezitu, a tím navodí mírný chronický systémový zánět. Potkani byli krmeni a napájeni každý den *ad libitum* po dobu celého pokusu.

Kompletní krmná směs MYPO je složena z pšenice, ovsa, pšeničných klíčků, sójové moučky, extrudované sóji, kukuřice, sušeného mléka, sušené syrovátky, sušených kvasnic, mletého vápence, monokalciumpfosfátu, chloridu sodného, L-lysin monohydrochloridu a premixu minerálů a vitamínů.

Po sedmi týdnech byla zvířata náhodně rozdělena do čtyř skupin po deseti potkanech a dalších sedm týdnů byla krmena těmito dietami:

- Dieta T (obsah nasycené kyseliny palmitové a stearové 55,4 % z celkového množství všech mastných kyselin, dieta T byla použita jako kontrola).
- Dieta S – kompletní krmná směs, světlicový olej 60 g/kg (obsah kyseliny linolové, LA [PUFA n-6] 65,7 %).

- Dieta F – kompletní krmná směs, rybí olej 60 g/kg (komerčně dostupný *jecoris aselli oleum* – rybí olej z tresčích jater, obsah kyseliny eikosapentaenové, EPA [PUFA n-3] 8,4 %).
- Dieta A – kompletní krmná směs, olej z řasy *Schizochytrium* 60 g/kg (DHASCO rostlinný olej z mikrořas, DSM Nutritional Products North America, Parsippany, NY, USA; obsah kyseliny dokosahexaenové, DHA [PUFA n-3] 29,1 %).

Celkový přehled zastoupených mastných kyselin v jednotlivých olejích je shrnut v tabulce 1.

Tabulka 1: Procentuální obsah n-3 a n-6 PUFA z celkového množství mastných kyselin v olejích přidávaných do krmiva pokusných zvířat.

Mastná kyselina	Olej ze světlice barvířské	Rybí olej	Olej z řasy <i>Schizochytrium</i>
Linolová (n-6)	61,7	9,5	5,9
α -linolenová (n-3)	0,4	1,4	0,4
Arachidonová (n-6)	0,5	0,8	0,7
Eikosapentaenová (n-3)	0,5	8,5	0,9
Dokosahexaenová (n-3)	1,4	11,2	32,3

Všechny krmné směsi byly připraveny v laboratoři, nejprve bylo nutné rozemlít peletizované MYPO a dále vytvořit homogenní směs s každým olejem, u T-diety s namletým lojem, kondenzovaným mlékem a premixem. Ze vzniklé směsi byly nachystány jednotlivé krmné dávky o hmotnosti 200 g. Diety S, F a A obsahovaly v jednom kilogramu 228 g bílkovin, 85 g tuku, 48 g vlákniny a 639 g bezdušíkatých látek výtažkových. Z obsahu živin byl pro tyto diety vypočten obsah metabolizovatelné energie 15,8 MJ/kg. T-dieta v jednom kilogramu obsahovala 145 g bílkovin, 208 g tuku, 26 g vlákniny, 621 g bezdušíkatých látek výtažkových a využitelná energie byla 18,9 MJ/kg.

Po 14 týdnech krmení byli potkani na 12 hodin vylačnění a pod anestezii isofluranem (halogenový ether) byly odebrány vzorky krve pomocí srdeční punkce. Po usmrcení potkanů pomocí předávkování isofluranem jim byla odebrána jaterní a epididymální tuková tkáň (v oblasti nadvarlete). Z každého zvířete byly odebrány dva vzorky od obou tkání. Vzorky krve byly nabrány do heparinových zkumavek a centrifugovány po dobu

10 minut při 200 × g a teplotě 4 °C. Vzorky jaterní tkáně o hmotnosti 1 a 5 g byly použity pro bezprostřední izolaci RNA a Western-blotting, pro který byl použit i vzorek epididymálního tuku o hmotnosti 5 g. Zbylé tkáně byly lyofilizovány a uchovány při teplotě -20 °C pro následné stanovení mastných kyselin.

4.2 Kvantifikace genové exprese

Z odebraných vzorků jater (30 mg) byla izolována celková RNA pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). Poté byla ověřena její kvalita na 1,2% RNA gelu, který byl vizualizován ethidiumbromidem. Stanovení koncentrace izolované RNA bylo provedeno na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Vzorky byly dále skladovány při teplotě -80 °C. Poté byl reverzně přepsán jeden mikrogram RNA pomocí Omniscript RT Kitu (Qiagen) a oligo-dT primerů. Takto získaná komplementární DNA byla použita ke kvantitativní PCR se specifickými primery pro *PPAR-γ*, *GPR120*, *AdipoR-1* a *AdipoR-2* potkanů. Jako vnitřní kontrola byl použit house-keepingový gen *Actb* pro β-aktin. Reakční směs obsahovala: 1 μl cDNA; 0,2 μl AmpErase[®] Uracyl N-glykosylázy (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA); 10 μl Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems); 0,2 μl každého primeru a 8,4 μl H₂O.

Všechny analýzy byly provedeny na přístroji 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Pro *PPAR-γ*, *GPR120*, *AdipoR-1* a *AdipoR-2* probíhala reakce za následujících podmínek: 2 min. inkubace při 50 °C, 10 minut při 95 °C, 40 cyklů po 15 s při 95 °C a 1 min. při 60 °C. Pro *Actb* následovně: 2 min. při 50 °C, 10 min. při 95 °C, 40 cyklů po 15 s při 95 °C, poté 30 s při 65 °C a 30 s při 60 °C. Denaturační program probíhal v jednom cyklu: 15 s při 95 °C, dále 1 min. při 60 °C, 30 s při 95 °C a 15 s při 60 °C. Poté byla vypočítána účinnost každé reverzní transkripce pomocí standardní metody používající křivku desetinásobného ředění vstupní cDNA. Každý PCR produkt byl ověřen sekvenováním pomocí BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit a přístroje ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Relativní změny v expresi jednotlivých genů u použitých diet (S, F a A; normalizovány k *Actb*) byly vypočteny ve vztahu k úrovni exprese shodného genu u kontrolní skupiny (dieta T), který byl taktéž normalizován k *Actb*. Tento výpočet byl proveden pomocí softwaru qbase+ (Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgium).

4.3 Stanovení proteinů – adiponektinu, PPAR- γ a NF- κ B

Z jater pokusných zvířat byly odebrány vzorky o přibližné hmotnosti 4 g a byly smíchány s pufrem A (0,25 M sacharóza, 10 mM Tris-HCl a 3 mM MgCl₂; 1 ml na 1 g vzorku) a směsí 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; Sigma-Aldrich, USA; 0,1 ml na 1 g vzorku). Tato směs byla homogenizována po dobu 5 min. na přístroji IKA® Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Spolková republika Německo) a následně centrifugována 5 min. při 300 \times g a teplotě 4 °C (Hettich Universal 32 R, Hettich, Spolková republika Německo). Poté byl odlit supernatant a peleta byla resuspendována ve 4 ml pufru A, byl přidán inhibitor proteáz a 1 % Tritonu-100 (například 10 μ l na 1 ml pufru A) a byla provedena homogenizace po dobu 5 min. Následně byla směs centrifugována při 300 \times g po dobu 5 min. při 4 °C. Supernatant byl skladován v -20 °C a následně použit pro stanovení obsahu β -aktinu a PPAR- γ v cytosolu pomocí Western-blotu.

Pro stanovení jaderného obsahu proteinů – β -aktinu, PPAR- γ a 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 a 10% glycerol) a bylo přidáno 0,2 ml inhibitoru proteáz. Směs byla centrifugována při 100 000 \times g po dobu 1 hod. při 4 °C. Následně byl supernatant použit ke stanovení obsahu jaderných proteinů pomocí Western-blotu.

K detekci adiponektinu byly odebrány vzorky epididymálního tuku o přibližné hmotnosti 4 g, které byly smíchány s pufrem A (1 ml na 1 g tukové tkáně) a směsí inhibitorů proteáz (stejně složení jako u předchozího stanovení; 0,1 ml na 1 g tkáně). Směs byla homogenizována po dobu 5 min. a poté centrifugována 5 min. při 300 \times g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odlit a peleta byla resuspendována ve směsi 4 ml pufru A, 0,4 ml inhibitoru proteáz a 1 % Tritonu-100 (například 10 μ l na 1 ml pufru A), celá směs byla homogenizována 5 min. Poté byla provedena centrifugace při 300 \times g po dobu 5 min. při 4 °C a supernatant byl skladován při -20 °C a následně použit pro stanovení obsahu β -aktinu a adiponektinu v cytosolu pomocí Western-blotu.

Před stanovením proteinů pomocí Western-blotu bylo provedeno měření pomocí biuretové metody. Vzorky byly zředěny, aby byly do gelu naneseny ve stejném množství 100 μ g, což bylo ověřeno pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue a detekcí β -aktinu Western-blotem.

Pro SDS-PAGE byl použit přístroj Mini Protean Tetra pro 4 – 20% Mini Protean TGX gely (Bio-Rad, USA). Před analýzou byly vzorky smíchány s redukujícím pufrům (5% β -merkeptoetanol) v poměru 2 : 1. Takto připravené vzorky byly vařeny 2 min. a poté naneseny do jamek gelu. Elektroforetická separace probíhala po dobu 1 hod. při 150 V (Power Basic, Bio-Rad, USA) v Tris-glycinovém pufru (0,025 M Tris; 0,19 M glycin a 3,5 mM SDS; pH 8,3).

Proteiny separované pomocí SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF (polyvinyliden difluorid) membránu (Bio-Rad, USA). Přenos probíhal v přístroji Biometra Fastblot (Biometra, Spolková republika Německo) za konstantního proudu 0,9 mA na 1 cm² membrány. Aktivace membrány byla provedena namáčením v roztoku metanolu po dobu 30 s, poté byla membrána na 5 min. přenesena do blotovacího pufru (12,5 mM tris, 75 mM glycin a 15 % (v/v) methanol). Po přenosu byla membrána blokována pufrům 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 min.

Poté byla membrána 2 hod. při 20 °C inkubována s protilátkami (záleželo na konkrétním stanovení – buď králičí anti- β -aktin, králičí anti-PPAR γ nebo králičí anti-NF- κ B; SantaCruz Biotechnology, USA) při ředění 1 : 200 v PBS s 0,1 % BSA. Inkubace s protilátkou králičím anti-adiponektinem (Sigma-Aldrich, USA) probíhala při zředění 1 : 1000 v PBS s 0,1 % BSA po dobu 2 hod. při 20 °C. Po inkubaci byly membrány třikrát po dobu 5 min. promyty v PBS s 0,05 % (v/v) Tween-20 (PBS-T). Následně byly inkubovány se sekundární anti-králičí protilátkou (kozí) značenou pomocí křenové peroxidázy (zředění 1 : 2000; Sigma-Aldrich) po dobu 1 hod. při 20 °C. Membrány byly třikrát po 5 min. promyty s PBS-T a vyvolány pomocí inkubace s chromogenním substrátem (3-aminoethyl-9-karbazolem) v 0,5 M acetátovém pufru (0,4 mg/ml s 0,1 % H₂O₂; pH 5,5). Reakce byla zastavena proplachováním vodou a membrány byly usušeny a naskenovány. Poté byla vypočítána optická hustota objemu proužků pomocí určení obrysů (Biolight software; Vilber-Lourmat, Francouzská republika).

4.4 Stanovení adiponektinu a vybraných cytokinů v plazmě

Hladina plazmatického adiponektinu a dvou prozánětlivých (IL-6, TNF- α) a dvou protizánětlivých (IL-10, TGF- β 1) cytokinů byla stanovena pomocí ELISA kitů (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) podle pokynů výrobce.

4.5 Stanovení mastných kyselin, glykémie a TAG

Lyofilizované vzorky jater byly homogenizovány a sonikovány, poté byla provedena filtrace, vytřepání a rozdělení pomocí separační nálevky. Vodná i hexanová vrstva byly reextrahovány a poté filtrovány. Následně byla provedena evaporace na rotační vakuové výparce (model RV 05-ST 1P-B; IKA Labortechnik, Staufen, Spolková republika Německo). Evaporace byla dokončena pod dusíkem a celkové lipidy byly stanoveny gravimetricky. Vzorky extrahovaného tuku o hmotnosti 50 mg byly smíchány s vnitřním standardem a butylhydroxytoluenem, sonikovány a následně derivatizovány. Takto získané metylestery mastných kyselin byly použity ke stanovení plynovou chromatografií na přístroji Hewlett-Pacard na kapilární koloně Innowax (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm; Agilent Technologies, J & W Scientific, Santa Clara, CA, USA). Injektor byl vyhříván na 260 °C a detektor na 275 °C. Teplotní program byl nastaven na 150 °C/1 min., gradient 10 °C/min. do dosažení 200 °C, gradient 3 °C/min. do dosažení 260 °C se zadržel 3 minuty. Nosným plynem byl dusík, s průtokem 1 ml/min., tlakem 145 kPa a dělicím poměrem 60 : 1.

Stanovení glukózy a TAG v plazmě bylo provedeno pomocí enzymatické kolorimetrické metody na automatickém analyzátoru BS-400 (Mindray, Čínská lidová republika) pomocí komerčních kitů (Greiner Diagnostic GmbH, Spolková republika Německo).

4.6 Statistické vyhodnocení

K vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými dietami ve všech znacích kromě genové exprese bylo použito jednostupňové třídění analýzy rozptylu a zjištění kontrastů Tukeyovým testem v programu STATISTICA 12 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). K vyhodnocení rozdílů v genové expresi byl použit program qbase+ (Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgium).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Hmotnost a příjem krmiva pokusných zvířat

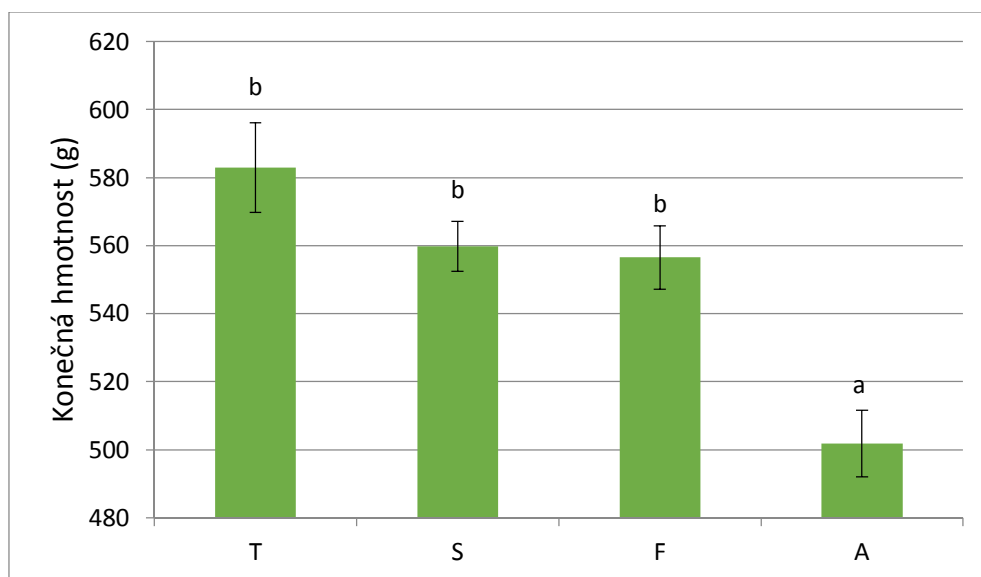
Potkani byli rozděleni v boxech po pěti, průměrný příjem krmiva u dané skupiny byl u T-diety 115 g/den, u S-diety 156 g/den, u F-diety 151 g/den a u A-diety 135 g/den. Průměrné hodnoty příjmu krmiva a hmotnosti pokusných zvířat v jednotlivých částech pokusu jsou znázorněny v tabulce 2.

Po 7 týdenním výkrmu dietou T nebyly mezi jednotlivými potkany pozorovány hmotnostní rozdíly, všichni jedinci se váhově pohybovali okolo 464 ± 21 g bez průkazných rozdílů ($P > 0,05$). Zkrmování jednotlivých diet (T, S, F, A) po dobu následujících 7 týdnů mělo průkazný vliv na snížení ($P < 0,05$) konečné hmotnosti u skupiny s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium* (A-dieta) v porovnání s T-dietou. Průkazné ($P < 0,05$) snížení hmotnosti u A-diety bylo zjištěno také při porovnání s S- a F-dietou (obr. 4). Dieta A také vykazovala výrazně nižší ($P < 0,05$) denní přírůstek oproti kontrole i dietě s obsahem rybího oleje (F; obr. 5). U ostatních diet nebyl pozorován žádný průkazný rozdíl. Živá hmotnost zvířat se na konci experimentu u jednotlivých diet pohybovala okolo těchto hodnot: T-dieta 583 ± 57 g, S-dieta 560 ± 30 g, F-dieta 557 ± 38 g a A-dieta 502 ± 42 g.

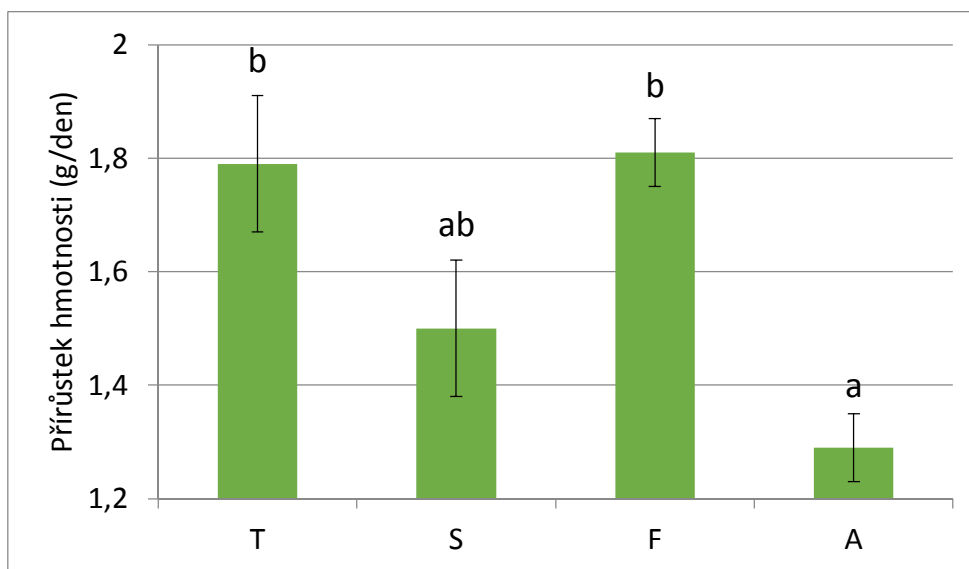
Mírný systémový zánět cíleně vyvolaný T-dietou byl srovnán s výzkumem autorů Sakai *et al.* (2013). V našem pokusu došlo ke zvýšení konečné hmotnosti a celkové glykémie (zvýšení o 5 % a 9 % ve srovnání s neutrální S-dietou), Sakai *et al.* (2013) pozorovali zvýšení konečné hmotnosti o 6 % a glykémie o 10 % ve srovnání s kontrolní dietou.

Tabulka 2: Průměrné hodnoty hmotnosti a příjmu krmiva u jednotlivých diet (T – kontrolní skupina, S – se světlicovým olejem, F – s rybím olejem, A – s olejem z řasy *Schizochytrium*) v průběhu pokusu (vše uvedeno v gramech, jen příjem krmiva je v g/den).

Dieta	Počáteční hmotnost	Hmotnost v polovině pokusu	Konečná hmotnost	Příjem krmiva jednotlivců/den
T	300 ± 37	486 ± 34	583 ± 57	23
S	294 ± 26	478 ± 25	560 ± 30	31
F	295 ± 32	459 ± 41	557 ± 38	30
A	294 ± 19	432 ± 33	502 ± 42	27



Obr. 4: Graf porovnávající konečné průměrné hmotnosti u jednotlivých diet ukazuje průkazné snížení hmotnosti ($P < 0,05$) u diety s olejem z řasy *Schizochytrium* (A) oproti všem ostatním skupinám (T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje). Uvedeny průměrné hodnoty se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem).



Obr. 5: Průměrný denní přírůstek u jednotlivých diet (T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*). Uvedeny průměrné hodnoty se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem).

5.2 Kvantifikace genové exprese

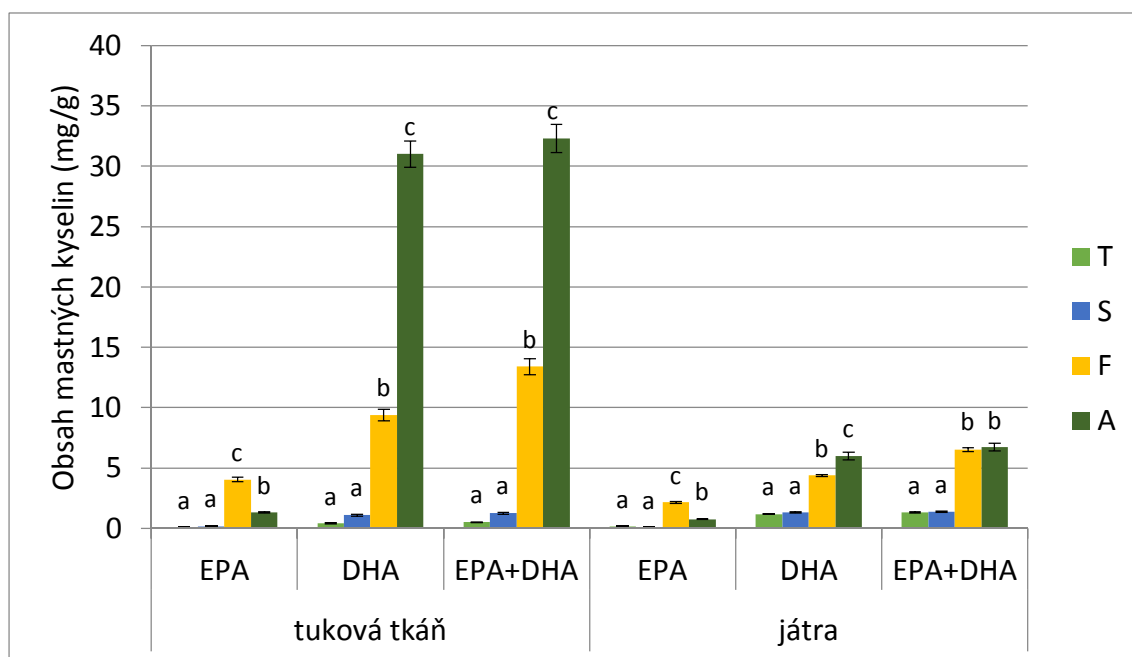
Byla naměřena snížená exprese ($P < 0,05$) u genů kódujících adiponetinové receptory AdipoR-1 a AdipoR-2 v jaterní tkáni u F- a A-diety ve srovnání s kontrolní skupinou T. Ani F-dieta, ani A-dieta neměly vliv na prokazatelné zvýšení ($P > 0,05$) exprese genu kódujícího receptor GPR120 v jaterní tkáni při srovnání s T-dietou. Na druhou stranu příjem kyseliny linolové u S-diety zvýšil ($P < 0,05$) expresi genu pro GPR120 při srovnání s kontrolou. Ačkoliv bylo prokázáno, že stimulace *GPR120* n-3 PUFA *in vitro* má protizánětlivý účinek (Oh *et al.*, 2010; Williams-Bey *et al.*, 2014), informace o přímém vlivu rybího oleje a oleje z řasy *Schizochytrium* na expresi *GPR120* nejsou dosud popsány v dostupné literatuře a není tedy možné porovnání.

Zkrmování dietou A vedlo k významnému zvýšení ($P < 0,05$) transkripce genu pro PPAR- γ při srovnání s ostatními skupinami včetně kontrolní. Zvýšená hladina adiponektinu byla v rozporu se sníženou expresí genů kódujících oba jeho receptory (AdipoR-1 a AdipoR-2) v jaterní tkáni příslušných potkanů. Dalším rozporem je průkazné zvýšení obsahu EPA i DHA v jaterní tkáni zvířat s F- a A-dietou (obr. 6) a zároveň snížená

($P < 0,05$) exprese genu kódujícího významný receptor pro obě tyto kyseliny a jejich následný příjem buňkami – GPR120. Naopak zvýšená exprese jaterního genu pro transkripční faktor PPAR- γ u A-diety oproti F-dietě splňuje předpoklad, že DHA je lepším ligandem pro tento receptor než EPA.

5.3 Zastoupení EPA, DHA a koncentrace proteinů ve tkáních

Příjem EPA + DHA byl v posledním týdnu experimentu u jednotlivých diet následující: T-dieta 0,2 + 0,1; S-dieta 3,4 + 4,4; F-dieta 227,8 + 260,5 a u A-diety 32,2 + 871,3 mg/kilogram živé hmotnosti a den. Depozice EPA a DHA v epididymální tukové a jaterní tkáni je znázorněna na obrázku 6.



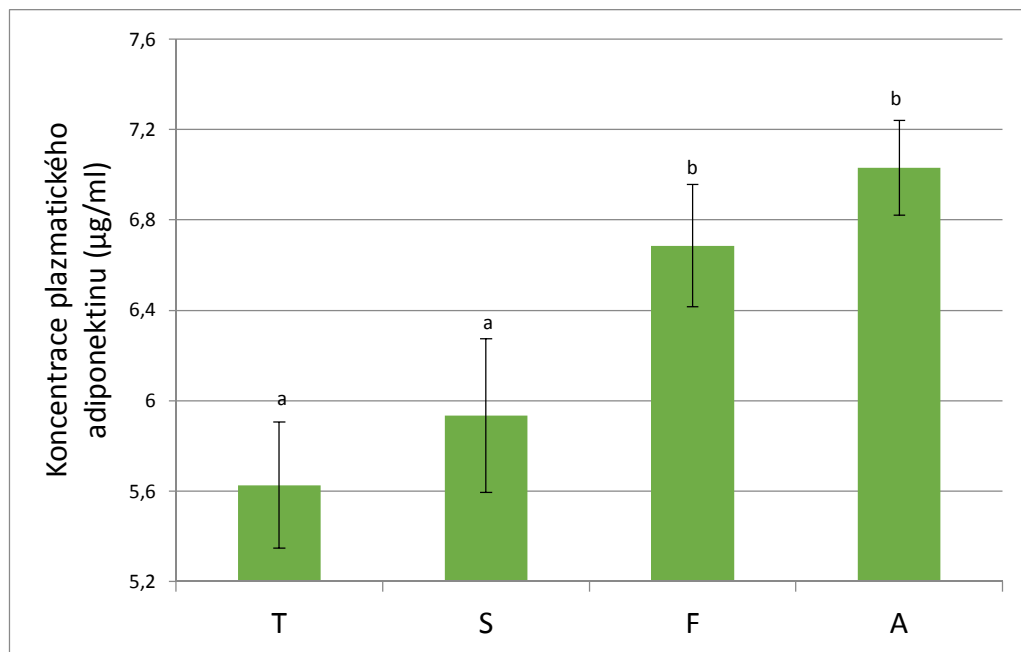
Obr. 6: Zastoupení kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) v tukové a jaterní tkáni a jejich součty u jednotlivých diet (T - kontrolní, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*). Uvedeny průměrné hodnoty se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem).

Při srovnání rybího oleje (F) a oleje z řasy *Schizochytrium* (A) byl zjištěn významný rozdíl ($P < 0,05$) v celkovém zastoupení EPA + DHA v tukové tkáni, kdy u A-diety bylo

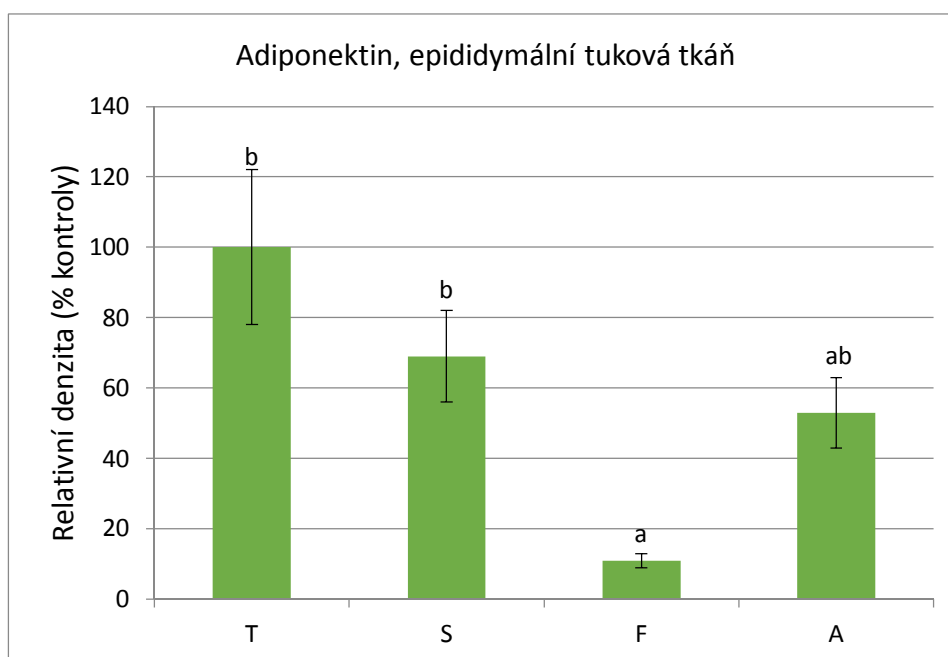
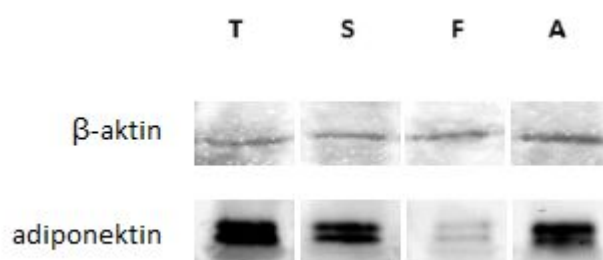
několikanásobně vyšší oproti všem ostatním skupinám. Dle teorie by toto významné zvýšení mělo vést k vyšší produkci adiponektinu a následně také k jeho zvýšenému uvolňování do krevního oběhu, což bylo potvrzeno (obr. 7). Zvýšená plazmatická koncentrace adiponektinu ($P < 0,05$) ve srovnání s kontrolou byla zjištěna jak u skupiny A, tak u skupiny F. Naopak v játrech byly hodnoty EPA + DHA vyrovnané. Vysoká koncentrace EPA + DHA v epididymálním tuku u A-diety nezpůsobila průkazné zvýšení ($P > 0,05$) adiponektinu v buňkách tkáně nad úroveň stanovenou u kontrolní skupiny T (obrázek 8). Hladina adiponektinu v epididymální tkáni vykazovala snižující se tendenci oproti kontrolní skupině, dieta F také snižovala ($P < 0,05$) množství adiponektinu ve srovnání s kontrolou.

Výsledky naší studie vlivu rybího oleje (EPA) a oleje z řasy *Schizochytrium* (DHA) na hladinu adiponektinu vykazují nejednoznačné výsledky – na jednu stranu byla pozorována tendence snížení obsahu v tukové tkáni, na druhou stranu významné zvýšení v plazmě. Tyto závěry se však neliší od jiných současných studií. Autoři Lefils *et al.* (2010) došli k závěrům, že DHA neovlivňuje hladinu adiponektinu v epididymální tukové tkáni u myší, ale významně zvyšuje množství adiponektinu v plazmě.

V experimentu autorů Oster *et al.* (2010) EPA a DHA neovlivňovaly množství buněčného adiponektinu u myších adipocytů, ačkoliv EPA i DHA zvyšovaly koncentraci do plazmy vylučovaného adiponektinu. Wang *et al.* (2007) se snažili vysvětlit rozpor mezi buněčným a do plazmy uvolňovaným adiponektinem a navrhli hypotézu, že ne všechen syntetizovaný adiponektin musí být nutně vylučován a může zůstat vázaný v adipocytech pomocí chaperonů endoplazmatického retikula. Jeho následná sekrece by pak mohla být řízena agonisty PPAR- γ (EPA, DHA). Navržený mechanismus však nevysvětluje sníženou hladinu proteinu v buňkách pozorovanou v našem experimentu u A- a F-diety. Proto jsme ve shodě s autory Oster *et al.* (2010) došli k závěru, že je nutné další studium působení EPA a DHA na produkci a uvolňování adiponektinu.



Obr. 7: Plazmatická koncentrace adiponektinu u jednotlivých diet (*T* – kontrolní, *S* – s přidavkem světlicového oleje, *F* – s přidavkem rybího oleje a *A* – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*). Uvedeny průměrné hodnoty se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem; stanoveno metodou ELISA).

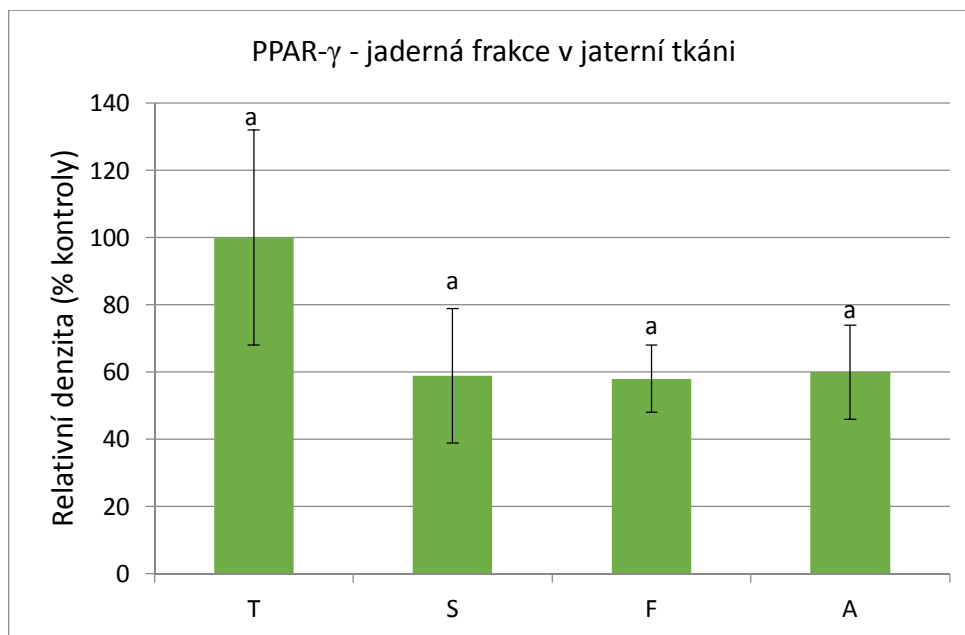
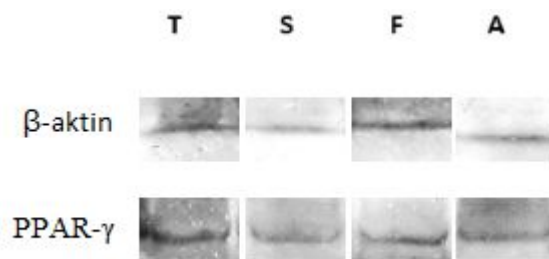


Obr. 8: Denzitometrická kvantifikace množství adiponektinu (vztaženo k β -aktinu) v epididymální tukové tkáni. T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*. Uvedeny průměrné hodnoty tří skvrn, z nichž každá reprezentuje homogenáty tkáni tří potkanů, se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem; stanoveno metodou Western-blot).

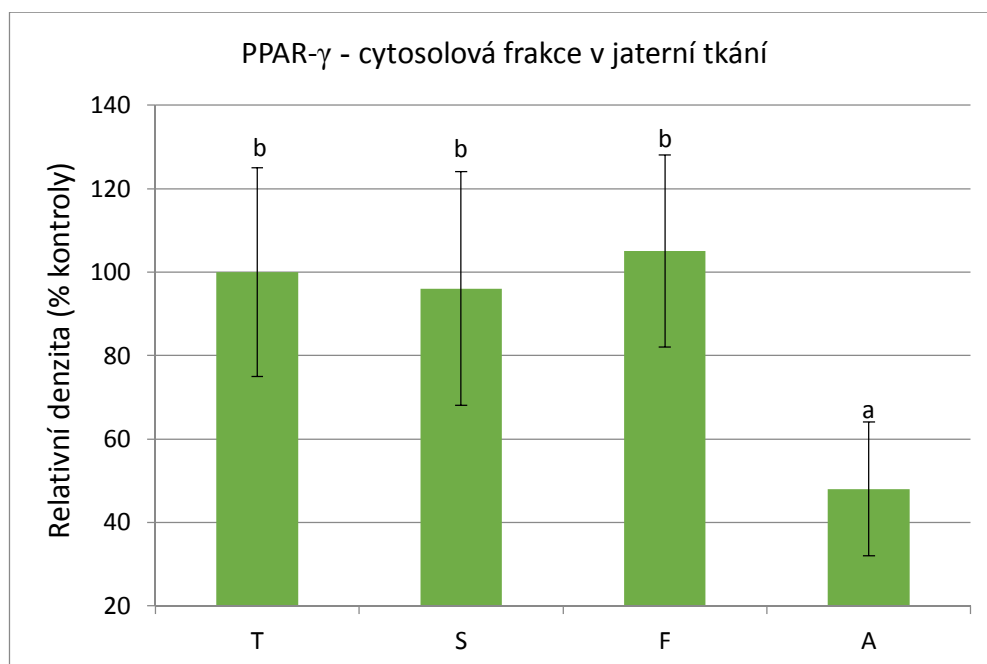
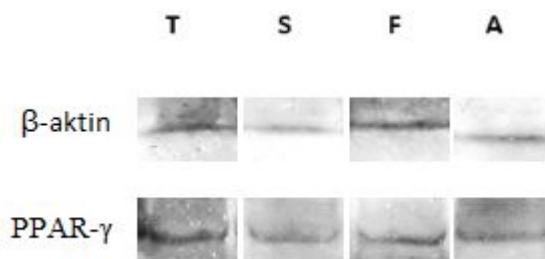
Zvýšení genové exprese *PPAR- γ* v jaterní tkáni navzdory předpokladům nevedlo ke zvýšení hladiny *PPAR- γ* proteinů v tkáni (obrázek 9). Jaderná frakce *PPAR- γ* v buňkách jater byla u F- i A-diety pouze 58, respektive 60 % kontroly a nevykazovala žádný významný rozdíl ($P > 0,05$) oproti kontrolní skupině. Cytosolová frakce *PPAR- γ* proteinů v jaterní tkáni byla u A-diety významně snížena ($P < 0,05$) oproti všem ostatním skupinám včetně kontrolní (obrázek 10).

Dieta s rybím olejem a olejem z řasy *Schizochytrium* vykazovala tendenci snižovat jadernou jaterní frakci PPAR- γ , což koreluje s výsledky dalších autorů: se sníženou expresí PPAR- γ v tukové tkáni při příjmu n-3 PUFA (Mejía-Barradas *et al.*, 2014) a se sníženou hladinou PPAR- γ mRNA po *in vitro* kultivaci adipocytů s EPA (Moreno-Aliagla *et al.*, 2010), respektive s DHA (Murali *et al.*, 2014).

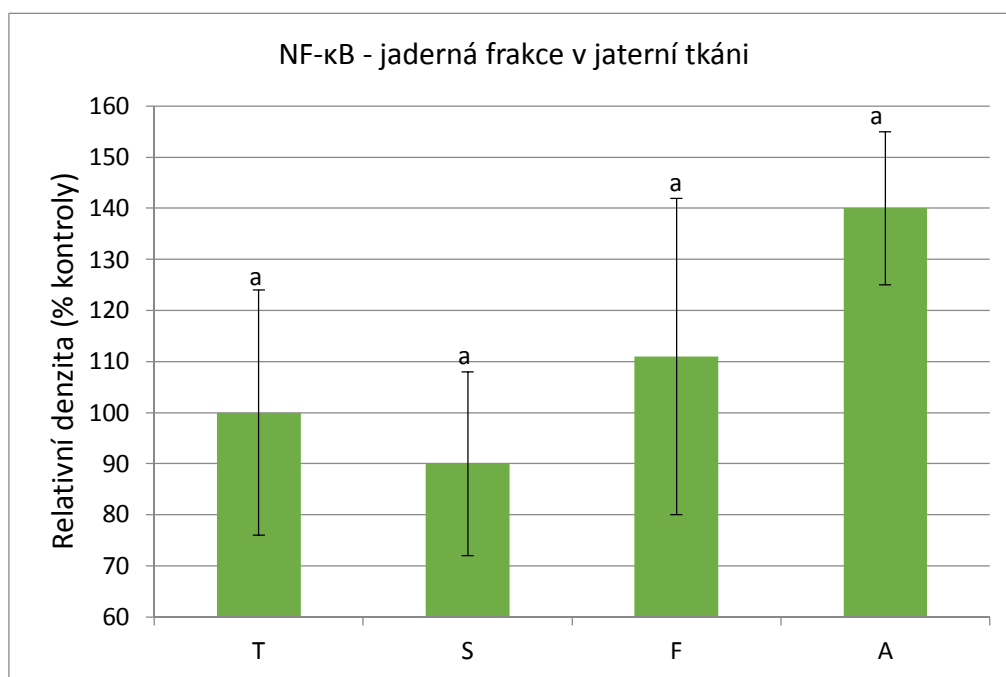
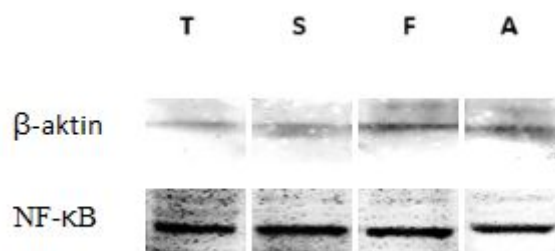
F- a A-dieta vykazovaly tendenci zvyšovat jadernou frakci transkripčního faktoru NF- κ B (111 a 140 % oproti kontrole, $P > 0,05$, obrázek 11), nebyl však nalezen žádný průkazný rozdíl, což je v souladu s poznatky autorů De Boer *et al.* (2014). Ve své studii došli tito autoři k závěru, že transkripčně aktivní NF- κ B pravděpodobně není vhodným ukazatelem pro stanovení stadia zánětlivého procesu v buňkách. Patel *et al.* (2012) dospěli k závěru, že vzhledem k obecně velmi vysoké koncentraci adiponektinu v plazmě potkanů, jsou signální dráhy související s adiponektinem pravděpodobně primárně ovlivňovány množstvím receptorů, ne pouze koncentrací ligandů. Tato teorie může alespoň částečně vysvětlit pozorované zvýšení jaderné frakce NF- κ B u A- a F-diety v souvislosti s tendencí snižovat expresi *AdipoR-1* a *AdipoR-2* v játrech v našem experimentu.



Obr. 9: Denzitometrická kvantifikace množství transkripčního faktoru PPAR- γ (receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů) v jaderné frakci jaterní tkáně (vztaženo k β -aktinu). T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy Schizochytrium. Uvedeny průměrné hodnoty tří skvrn, z nichž každá reprezentuje homogenáty tkáně tří potkanů, se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem; stanoveno metodou Western-blot).



Obr. 10: Denzitometrická kvantifikace množství transkripčního faktoru PPAR- γ (receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů) v cytosolové frakci jaterní tkáně (vztaženo k β -aktinu). T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*. Uvedeny průměrné hodnoty tří skvrn, z nichž každá reprezentuje homogenáty tkání tří potkanů, se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem; stanoveno metodou Western-blot).



Obr. 11: Denzitometrická kvantifikace množství transkripčního faktoru jaderného faktoru kappa B (NF- κ B) v jaderné frakci jaterní tkáně (vztaženo k β -aktinu). T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*. Uvedeny průměrné hodnoty tří skvrn, z nichž každá reprezentuje homogenáty tkáně tří potkanů, se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem; stanoveny metodou Western-blot).

5.4 Stanovení cytokinů

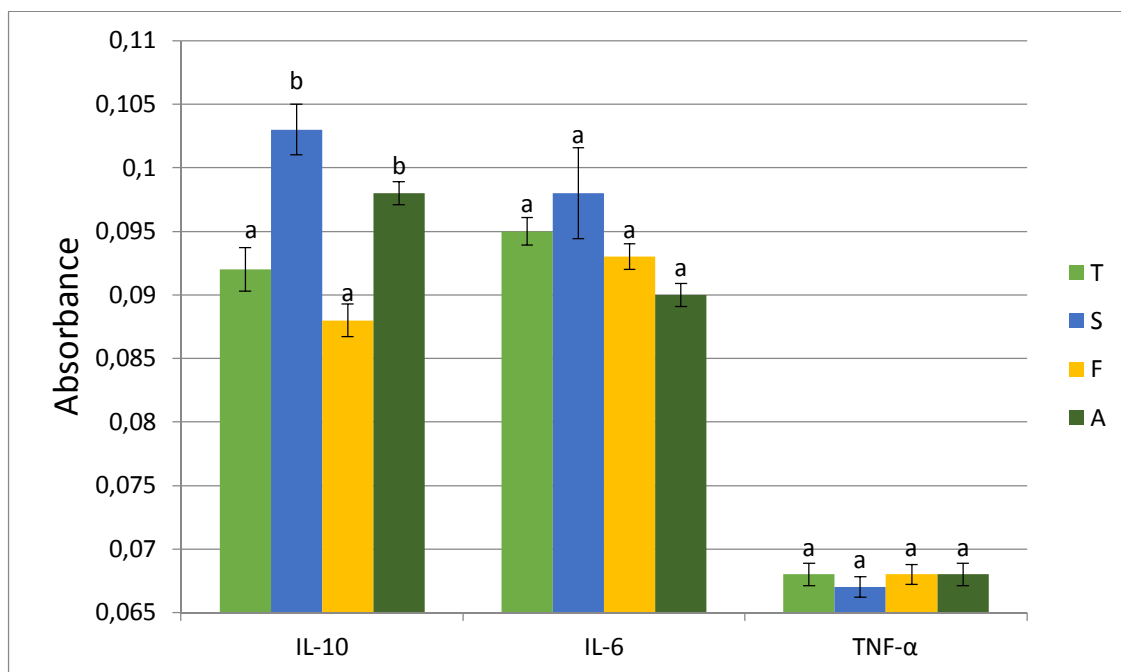
Jelikož nebyly zjištěny průkazné rozdíly v množství jaderné i cytosolické frakce proteinu PPAR- γ ani v množství jaderné frakce transkripčního faktoru NF- κ B, není překvapivé, že nebyly zjištěny ani rozdíly v plazmatické hladině jednotlivých prozánětlivých cytokinů – IL-6 a TNF- α mezi jednotlivými skupinami. Plazmatická

hladina těchto cytokinů byla příliš nízká, aby bylo možno ji vyjádřit v jednotkách koncentrace podle protokolu výrobce jednotlivých ELISA kitů na základě měření absorbance (obrázek 12).

Naše výsledky se neodlišují od dostupné literatury. Autoři Vigerust *et al.* (2013) studovali vliv rybího oleje na produkci prozánětlivých cytokinů u myších samců krmených dietou s vysokým obsahem tuků a neprokázali žádné významné ovlivnění. Příjem EPA a DHA taktéž neovlivnil zvýšení hladiny IL-6, IL-1 β a TNF- α při indukovaném zánětu u pokusných potkanů (Hall *et al.*, 2012). Autoři Schuster *et al.* (2014) dokonce pozorovali prozánětlivé působení DHA na zánět dýchacích cest u myšího modelu. Na druhou stranu autoři Olson *et al.* (2013) ve své studii na myším modelu zjistili snížení hladiny IL-1 β a zvýšení hladiny IL-10 působením DHA.

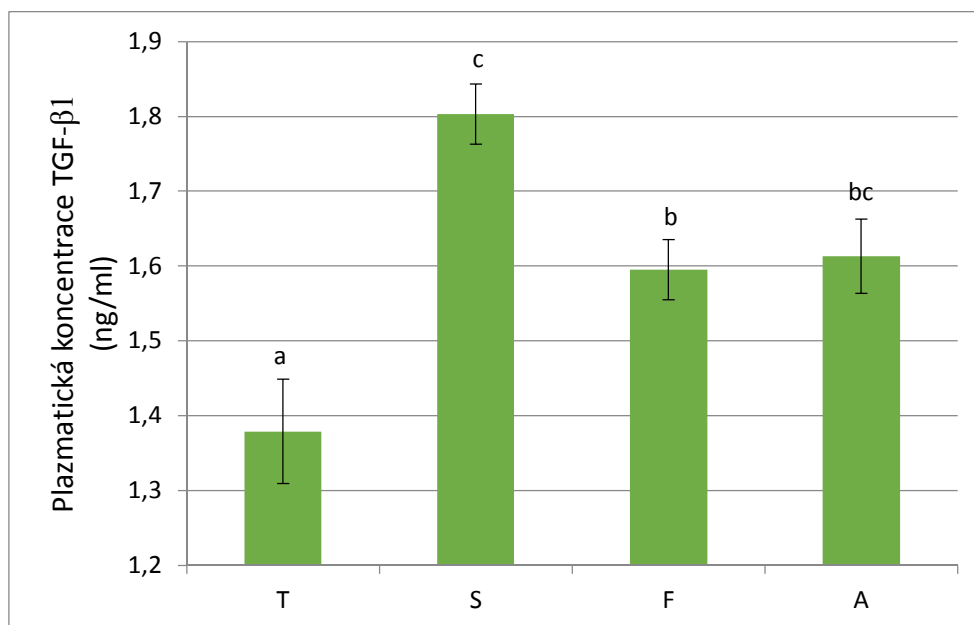
Výsledky odpovídajících studií na lidech ukazují, že EPA a DHA neovlivňují hladinu prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α u obézních pacientů (Labonté *et al.*, 2013). Autoři Bragt a Mensink (2012) nepozorovali žádný vliv rybího oleje na množství TNF- α a IL-6 u obézních pacientů. V další studii nebyl pozorován vliv EPA a DHA na množství IL-1 β , IL-6 a TNF- α u zdravých dobrovolníků (Skulas-Ray *et al.*, 2011).

V naší studii nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ($P > 0,05$) mezi jednotlivými dietami v hladinách prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α . Na druhou stranu hladina protizánětlivého cytokinu IL-10 byla významně zvýšena ($P < 0,05$) v plazmě u zvířat s A- a S-dietou ve srovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 12: Kvantifikace prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α a protizánětlivého cytokinu IL-10 (kvantifikováno pouze na základě absorbance, nikoliv koncentrace, v důsledku nízkých hladin cytokinů naměřených metodou ELISA). Diety: T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*. Uvedeny průměrné hodnoty se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem).

Jediný cytokin, u kterého bylo možné stanovení plazmatické koncentrace, byl protizánětlivý TGF- β 1. Zkrmování S-, F- a A-diety vedlo k významnému zvýšení hladiny TGF- β 1 v plazmě při srovnání s kontrolou (obrázek 13). Nejvýznamnější zvýšení hladiny IL-10 a TGF- β 1 oproti kontrole bylo zjištěno u diety s přidavkem oleje ze světlice barvířské (S) a s olejem z řasy *Schizochytrium* (A).



Obr. 13: Srovnání plazmatické koncentrace transformujícího růstového faktoru $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) u jednotlivých diet (T – kontrolní skupina, S – s přidavkem světlicového oleje, F – s přidavkem rybího oleje a A – s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium*). Uvedeny průměrné hodnoty se střední chybou průměru. Rozdílná písmena u jednotlivých sloupců značí statisticky významné rozdíly na hladině $P < 0,05$ (jednostupňová ANOVA s následným Tukeyovým testem).

Výsledky ukazují, že podávané množství EPA a DHA obsažené v F-, respektive v A-dietě nemělo průkazný vliv na hladinu testovaných prozánětlivých cytokinů. K těmto závěrům došly i jiné *in vivo* studie, což je však v rozporu s *in vitro* pokusy, které mají jednoznačně pozitivní výsledky. Otevírá se zde tedy prostor k dalšímu výzkumu vlivu n-3 PUFA na markery zánětu v organismu.

6 ZÁVĚRY

Cílem naší práce bylo otestovat působení oleje z řasy *Schizochytrium* na plazmatické a jaterní ukazatele rizika aterosklerózy a ukazatele chronického mírného zánětu u pokusných potkanů po zkrmování pro-aterogenní diety.

Mírný systémový zánět byl navozen příjmem diety obsahující hovězí lůj a slazené kondenzované mléko (T-dieta) po dobu 7 týdnů. Poté byli potkani rozděleni do čtyř hmotnostně vyvážených skupin po deseti jedincích. Kontrolní skupina byla nadále krmena T-dietou, další skupina dostávala krmivo obohacené olejem z řasy *Schizochytrium* (A-dieta, vysoký obsah n-3 PUFA, převážně DHA), dále s přídatkem rybího oleje (F-dieta, vysoký obsah n-3 PUFA, převážně EPA) a dietou s olejem ze světlice barviřské (S-dieta, vysoký obsah n-6 PUFA, především kyseliny linolové).

Byla zjišťována depozice EPA a DHA ve viscerální tukové tkáni, kde je převážně produkován adiponektin, jehož plazmatická koncentrace byla následně pomocí ELISA metody stanovena. Testovali jsme také systémové působení EPA a DHA pomocí stanovení hladiny exprese jaterních genů kódujících adiponektinové receptory (*AdipoR-1*, *AdipoR-2*), genu *GPR120* kódujícího hlavní receptor pro vstup EPA a DHA do buněk a genu kódujícího transkripční faktor PPAR- γ (jaderná a cytoplazmatická frakce). Pomocí Western-blotu bylo stanoveno množství jaderné frakce transkripčního faktoru NF- κ B kódujícího prozánětlivé cytokiny. Stanovení hladiny vybraných cytokinů probíhalo pomocí ELISA kitů. Sledovány byly dva prozánětlivé (TNF- α , IL-6) a dva protizánětlivé (IL-10, TGF- β 1) cytokiny.

Výsledky ukázaly, že olej z řasy *Schizochytrium* (A-dieta) průkazně snižuje hmotnost pokusných zvířat oproti všem ostatním skupinám. Také průměrný denní přírůstek hmotnosti byl u A-diety průkazně nižší při srovnání s kontrolní skupinou a dietou s obsahem rybího oleje (F-dieta). A-dieta vedla ke snížení glykémie ve srovnání s kontrolou a měla tendenci ji snižovat při srovnání s F- i S-dietou.

Při srovnání depozice DHA a celkové sumy EPA + DHA ve viscerální tukové tkáni potkanů vykazovala A-dieta několikanásobně vyšší hodnoty než všechny ostatní skupiny. Tyto hodnoty by měly vést ke zvýšené produkci a následné sekreci adiponektinu, což bylo potvrzeno. Avšak zvýšená plazmatická koncentrace byla pozorována také u F-diety. Zvýšená hladina plazmatického adiponektinu však byla v rozporu se sníženou expresí

genů kódujících oba adiponektinové receptory v jaterní tkáni. Zvýšená depozice EPA a DHA u A- a F-diety byla také v rozporu se sníženou expresí genu kódujícího receptor GPR120 zprostředkující vstup EPA a DHA do buněk. Naopak bylo potvrzeno, že DHA je lepším ligandem PPAR než EPA, jelikož zkrmování A-dietou vedlo k významnému zvýšení exprese jaterního genu pro transkripční faktor PPAR- γ ve srovnání s F-dietou.

V předkládané práci nebyly pozorovány rozdíly v množství cytosolické i jaderné frakce proteinu PPAR- γ . Také nebyly zjištěny rozdíly u jaderné frakce transkripčního faktoru NF- κ B, díky čemuž nebyly pozorovány významné rozdíly v hladině prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α mezi jednotlivými dietami. Naopak bylo pozorováno zvýšení produkce protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β 1 u A-diety při srovnání s kontrolou. Nejvýraznější zvýšení hladiny těchto cytokinů však bylo pozorováno u S-diety.

V našem experimentu byl jako modelový organizmus použit laboratorní potkan, který je považován za vhodný model pro studium aterosklerózy a jejích rizikových faktorů. Z uvedených výsledků vyplývá, že je možné doporučit olej z řasy *Schizochytrium* jako vhodný doplněk humánní stravy v rámci prevence vzniku chronických degenerativních onemocnění. Výsledky experimentu ukázaly u oleje z řasy *Schizochytrium* lepší hodnoty při srovnání s často doporučovaným rybím olejem. A to jak u snížení hmotnosti, glykémie či jeho potenciálu v tlumení mírného chronického zánětu v organizmu.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J. A., Reddy S. T. 2003. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(4): 1751–6. doi: 10.1073/pnas.0334211100.

Balk E. M., Lichtenstein A. H., Chung M., Kupelnick B., Chew P., Lau J. 2006. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. *Atherosclerosis*. 189: 19–30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.012.

Barros M. P., Poppe S. C., Bondan E. F. 2014. Neuroprotective properties of marine carotenoid astaxanthin and omega-3 fatty acids, and perspectives for the natural combination of both in krill oil. *Nutrients*. 6(3): 1293–1317. doi: 10.3390/nu6031293.

Biasi F., Mascia C., Poli G. 2008. The contribution of animal fat oxidation products to colon carcinogenesis, through modulation of TGF- β 1 signaling. *Carcinogenesis*. 29(5): 890–4. doi: 10.1093/carcin/bgn106.

Bragt M. C. E., Mensink R. P. 2012. Comparison of the effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and fenofibrate on markers of inflammation and vascular function, and on the serum lipoprotein profile in overweight and obese subjects. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22: 966–973. doi: 10.1016/j.numecd.2010.12.010.

Brown A. L., Zhu X., Rong S., Shewale S., Seo J., Boudyguina E., Gebre A. K., Alexander-Miller M. A., Parks J. S. 2012. Omega-3 fatty acids ameliorate atherosclerosis by favorably altering monocyte subsets and limiting monocyte recruitment to aortic lesions. *Arterioscler. Thromb., Vasc. Biol.* 32(9): 2122–2130. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.253435.

Burdge G. 2004. α -Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implication. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 7: 137–144. doi: 10.1097/01.mco.0000120006.58274.0c.

Calder P. C. 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent. Fatty Acids*. 75: 197–202. doi: 10.1016/j.plefa.2006.05.012.

Calder P. C. 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent. Fatty Acids*. 77: 327–335. doi: 10.1016/j.plefa.2007.10.015.

Chýlková A., Kolorz M., Bartošová L. 2010. Tumor necrosis factor: jeho význam v patogenezi a terapii nespecifických střevních zánětů, revmatoidní artritidy a dalších onemocnění souvisejících s poruchami imunitního systému. *Klin. Farmakol Farm.* 24(2): 89–92.

Cintra D. E., Ropelle E. R., Moraes J. C., Pauli J. R., Morari J., de Souza C. T., Grimaldi R., Stahl M., Carnevali J. B., Saad M. J., Velloso L. A. 2012. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 7(1): e30571. doi: 10.1371/journal.pone.0030571.

Cockbain A. J., Toogood G. J., Hull M. A. 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*. 61: 135–149. doi: 10.1136/gut.2010.233718.

Dąbek J., Kułach A., Gąsior Z. 2010. Nuclear faktor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB): a new potential therapeutic target in atherosclerosis? *Pharmacol. Rep.* 62: 778–83. doi: 10.1016/S1734-1140(10)70338-8.

Das N. U. 2006. Essential Fatty Acids – A Review. 2006. *Curr. Pharm. Biotechnol.* Vol. 7, No. 6. doi: 10.2174/138920106779116856.

Deckelbaum R. J., Worgall T. S., Seo T. 2006. n-3 Fatty acids and gene expression. *Am. J. Clin. Nutr.* 83: 1520–5. ISSN: 1938-3207.

Dudová S., Hájek R. 2008. Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klin. Onkol.* 21: 220–2. ISSN: 0862-495X.

Gladine C., Newman J. W., Durand T., Pedersen T. L., Galano J. - M., Demougeot C., Berdaux O., Pujos-Guilot E., Mazur A., Comte B. 2014. Lipid profiling following intake of the omega 3 fatty acid DHA identifies the peroxidized metabolites F4-neuroprostanes as the best predictors of atherosclerosis prevention. *PLoS ONE*. 9(2): e89393. doi: 10.1371/journal.pone.0089393.

Fetterman J. W., Zdanowicz M. M. 2009. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 66(13): 1169–79. doi: 10.2146/ajhp080411.

Ghosh S., Hayden M. S. 2008. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 8(11): 837–48. doi: 10.1038/nri2423.

Grofová Z. 2010. Mastné kyseliny. *Med. praxi.* 7(10): 388–390.

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. *J. Neurochem.* 121: 738–750. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07726.x.

Haluzík M., Pařízková J., Haluzík M. M. 2004. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol. Res.* 53(2): 123–9. ISSN: 0862-8408.

Han S. H., Quon M. J., Koh K. K. 2005. Beneficial vascular and metabolic effects of peroxisome proliferator-activated receptor- α activators. *Hypertension*. 46: 1086–1092. doi: 10.1161/01.HYP.0000187900.36455.4c.

Han W., Zhao H., Jiao B., Liu F. 2014. EPA and DHA increased PPAR γ expression and decreased integrin-linked kinase and integrin β 1 expression in rat glomerular mesangial cells treated with lipopolysaccharide. *Biosci. Trends.* 8(2): 120–5. doi: 10.5582/bst.8.120.

Harris W. S., Rambjør G. S., Windsor S. L., Diedrich D. 1997. n-3 Fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 459–64.

Hayhurst G. P., Lee Y-H., Lambert G., Ward J. M., Gonzalez F. J. 2001. Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 21(4): 1393–1403. doi: 10.1128/MBC.21.4.1393-1403.2001.

Heidt M. C., Vician M., Stracke S. K., Stadlbauer T., Grebe M. T., Boening A., Vogt P. R., Erdogan A. 2009. Beneficial effects of intravenously administered N-3 fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a prospective randomize study. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 57(5): 276–80. doi: 10.1055/s-0029-1185301.

Hrstka R., Kolářová T., Michalová E., Vojtěšek B. 2014. Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi. *Klin. Onkol.* 27(1): 69–74. ISSN: 1802-5307.

Jiráček R., Zeman M. 2007. Vliv omega-3 a omega-6 nenasycených mastných kyselin na psychické poruchy. *Čes. slov. psychiatr.* 103(8): 420–426. ISSN: 1212-0383.

Jones D. C., Ding X., Daynes R. A. 2002. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J. Biol. Chem.* 277(9): 6838–45. doi: 10.1074/jbc.M106908200.

Kromhout D., de Goede J. 2014. Update on cardiometabolic health effects of ω -3 fatty acids. *Curr. Opin. Lipidol.* 25(1): 85–90. doi: 10.1097/MOL.0000000000000041.

Labonté M-È., Couture P., Tremblay A. J., Hogue J-C., Lemelin V., Lamarche B. 2013. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementation and inflammatory gene expression in the duodenum of obese patients with type 2 diabetes. *Nutr. J.* 12: 98. doi: 10.1186/1475-2891-12-98.

Larsson S. C., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M., Wolk A. 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanism. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(6): 935–945. ISSN: 1938-3207.

Lefils J., Gélóën A., Vidal H., Lagarde M., Bernoud-Hubac N. 2010. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br. J. Nutr.* 104: 1304–1312. doi: 10.1017/S0007114510002102.

Lukiw W. J., Bazan N. G. 2008. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J. Nutr.* 138(12): 2510–4. doi: 10.3945/jn.108.096016.

Luquet S., Gaudel C., Holst D., Lopez-Soriano J., Jehl-Pietri C., Fredenrich A., Grimaldi P. A. 2005. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740: 313–317. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.11.011.

Manson J. A., Bassuk S. S., Lee I-M., Cook N. R., Albert M. A., Gordon D., Zaharris E., MacFadyen J. G., Danielson E., Lin J., Zhang S. M., Buring J. E. 2012. The VITamin D and OmegaA-3 TriaL (VITAL): Rationale and design of a large randomized controlled trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease. *Contemp. Clin. Trials.* 1: 159–171. doi: 10.1016/j.cct.2011.09.009.

Mejía-Barradas C. M., Del-Río-Navarro B. E., Domínguez-López A., Campos-Rodríguez R., Martínez-Godínez M. de los-Á., Rojas-Hernández S., Lara-Padilla E., Abarca-Rojano E., Miliar-García Á. 2014. The consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulates gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and hypoxia-inducible factor 1 alpha in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents. *Endocrine.* 45: 98–105. doi: 10.1007/s12020-013-9941-y.

Michalik L., Desvergne B., Wahli W. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ : emerging roles for a previously neglected third family member. *Curr. Opin. Lipidol.* 14: 129–135.

Moreno-Aliaga M. J., Lorente-Cebrián S., Martínez J. A. 2010. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc. Nutr. Soc.* 69(3): 324–32. doi: 10.1017/S0029665110001801.

Murali G., Desouza C. V., Clevenger M. E., Ramalingam M., Saraswathi V. 2014. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Prostaglandins, Leukotriens and Essent. Fatty Acids*. 90: 13–21. doi: 10.1016/j.plefa.2013.10.002.

Novak T. E., Babcock T. A., Jho D. H., Helton W. S., Espat N. J. 2003. NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. *Am. J. Physiol.* 284: 84–89. doi: 10.1152/ajplung.00077.2002.

Oh D. Y., Talukdar S., Bae E. J., Imamura T., Morinaga H., Fan W., Li P., Watkins S. M., Olefsky J. M. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin sensitizing effects. *Cell*. 142(5): 687–698. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.041.

Olson M. V., Liu Y-C., Dangi B., Zimmer J. P., Salem N., Nauroth J. M. 2013. Docosahexaenoic acid reduces inflammation and joint destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Inflammation Res.* 62: 1003–1013. doi: 10.1007/s00011-013-0658-4.

Oster T. T., Tishinski J. M., Yuan Z., Robinson L. E. 2010. Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPAR γ mRNA, in 3T3-L1 adipocytes. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 35: 783–789. doi: 10.1139/H10-076.

Patel S. A., Hoehn K. L., Lawrence R. T., Sawbridge L., Talbot N. A., Tomsig J. L., Turner N., Cooney G. J., Whitehead J. P., Kraegen E. W., Cleasby M. E. 2012. Overexpression of the adiponectin receptor AdipoR1 in rat skeletal muscle amplifies local insulin sensitivity. *Endocrinology*. 153: 5231–5246. doi: 10.1210/en.2012-1368.

Peč J., Dušek J. 2008. Složení a využití konopného oleje se zaměřením na terapeutické účinky esenciálních mastných kyselin. *Prakt. lékáren.* 4(2): 86–89. ISSN: 1803-5329.

Peters J. M., Lee S. S. T., Li W., Ward J. M. Gavrilova O., Everett C., Reitman M L., Hudson L. D., Gonzalez F J. 2000. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor $\beta(\delta)$. *Mol. Cell. Biol.* 20(14): 5119–5128. PMCID: PMC85961.

Rosen E. D., Spiegelman B. M. 2001. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276(41): 37731–4. doi: 10.1074/jbc.R100034200

Ross J. A., Moses A. G. W., Fearon K. C. H. 1999. The anti-catabolic effects of n-3 fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2: 219–226. PMID: 10456251.

Sakai S., Iizuka N., Fujiwara M., Miyoshi M., Aoyama M., Maeshige N., Hamada Y., Usami Y., Usami M. 2013. Mild obesity reduces survival and adiponectin sensitivity in endotoxemic rats. *J. Surg. Res.* 185: 353–363. doi: 10.1016/j.jss.2013.06.002.

Sanderasa C. M., Chung M. K., Van Wagoner D. R., Barringer T. A., Allen K., Ismail H. M., Zimmerman B., Olshansky B. 2012. A randomized, placebo-controlled trial of omega-3 fatty acids for inhibition of supraventricular arrhythmias after cardiac surgery: The FISH trial. *J. Am. Heart Assoc.* 1(3): e000547. doi: 10.1161/JAHA.111.000547.

Schmitz G., Ecker J. 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 47: 147–155. doi: 10.1016/j.plipres.2007.12.004.

Schumann J., Fuhrmann H. 2010. Impairment of NF κ B activity by unsaturated fatty acids. *International Immunopharmacology.* 10(8): 978–84. doi: 10.1016/j.intimp.2010.05.011

Schuster G. U., Bratt J. M., Jiang X. W., Pedersen T. L., Grapov D., Adkins Y., Kelley D. S., Newman J. W., Kenyon N. J., Stephensen C. B. 2014. Dietary long-chain omega-3 fatty acids do not diminish eosinophilic pulmonary inflammation in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50: 626–636. doi: 10.1165/rcmb.2013-0136OC.

Skulas-Ray A. C., Kris-Etherton P. M., Harris W. S., Vanden Heuvel J. P., Wagner P. R., West S. G. 2011. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 243–252. doi: 10.3945/ajcn.110.003871.

Simopoulos A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56: 365–379. PMID: 12442909.

Simopoulos A. P. 2011. Evolutionary aspects of diet: The omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol. Neurobiol.* 44: 203–215. doi: 10.1007/s12035-010-8162-0.

Sznajdman M. L., Haffner C. D., Maloney P. R., Fivush A., Chao E., Goreham D., Sierra M. L., LeGrumelec C., Xu H. E., Montana V. G., Lambert M. H., Willson T. M., Oliver W. R., Sternbach D. D. 2003. Novel selective small molecules agonists for peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) – synthesis and biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 1517–1521. doi: 10.1016/S0960-894X(03)00207-5.

Šmahelová A. 2005. Receptory aktivované peroxizomovými proliferátory a inzulinové receptory v mozku. Diabetes a neuropsychická onemocnění. *Vnitř. Lék.* 51(52): 565–8.

Touvier M., Kesse-Guyot E., Andreeva V. A., Fezeu L., Charnaux N., Sutton A., Druesne-Pecollo N., Hercberg S., Galan P., Zelek L., Latino-Martel P., Czernichow S. 2012. Modulation of the association between plasma intercellular adhesion molecule-1 and cancer risk by n-3 PUFA intake: a nested case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* 95: 944–50. doi: 10.3945/ajcn.111.027805.

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 . *Eur. J. Nutr.* 52: 1315–1325. doi: 10.1007/s00394-012-0441-2.

Walloschke B., Fuhrmann H., Schumann J. 2010. Enrichment of RAW264.7 macrophages with essential 18-carbon fatty acids affects both respiratory burst and production of immune modulating cytokines. *J. Nutr. Biochem.* 21(6): 556–60. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.03.007.

Wang D., DuBois N. R. 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 10(3): 181-193. doi: 10.1038/nrc2809.

Woutersen R. A., Appel M. J., van Garderen-Hoetmer A., Wijnands M. V. 1999. Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 443: 111–127. doi: 10.1016/S1383-5742(99)00014-9.

Wang Z. W., Schraw T. D., Kim J. Y., Khan T., Rajala M. W., Follenzi A., Scherer P. E. 2007. Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Mol. Cell. Biol.* 27: 3716–3731.

Weyer C., Funahashi T., Tanaka S., Hotta K., Matsuzawa Y., Pratley R. E., Tataranni P. A. 2001. Hypoadiponemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(5): 1930–5. doi: 10.1128/MBC.00931-06.

Williams-Bey Y., Boullaran C., Vural A., Huang N-N., Hwang I.-Y., Snan-Shi C., Kehrl J. H. 2014. Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF- κ B activation and enhancing autophagy. *PLoS ONE.* 9(6): e97957. doi: 10.1371/journal.pone.0097957.

Xu J., Cho H., O'Malley S., Park J. H., Clarke S. D. 2002. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanism. *J. Nutr.* 132: 3333–9. ISSN: 1541-6100.

Yamauchi T., Nio Y., Maki T., Kobayashi M., Takazawa T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., Kawamoto S., Kubota N., Kubota T., Ito Y., Kamon J., Tsuchida A., Kumagai K., Kozono H., Hada Y., Ogata H., Tokuyama K., Tsunoda M., Ide T., Murakami K., Awazawa M., Takamoto I., Froguel P., Hara K., Tobe K., Nagai R., Ueki K., Kadowaki T. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* 13: 332–339. doi: 10.1038/nm1557.

Yang T., Espenshade P. J., Wright M. E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J. L., Brown M. S. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 110(4): 489–500. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00872-3.

Zeitlin L., Segev E., Fried A., Wientroub S. 2003. Effects of long-term administration of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and selective estrogen receptor modulator (SERM) derivatives in ovariectomized (OVX) mice. *J. Cell. Biochem.* 90: 347–60. doi: 10.1002/jcb.10620.

Zhao Y., Joshi-Barve S., Barve S., Chen L. H. 2004. Eicosapentaenoic acid prevent LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. *J. Am. Coll. Nutr.* 23: 71–78. PMID: 14963056.

Žák A., Tvrzická E., Zeman M., Vecka M. 2005. Patofyziologie a klinický význam vícenenasycených mastných kyselin řady n-3. *Čas. Lék. čes.* 144, Suppl. 1: 6–18. ISSN: 1805-4420

Knihy:

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Wilson J., Hunt T. 2008. *Molecular biology of THE CELL, fifth edition*. Garland Science, Taylor & Francis Group. 1601 s.

Haluzík M., Svačina Š. 2005. *Metabolický syndrom a nukleární receptory – PPAR*. Grada Publishing, a.s. 128 s.

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. 2002. *Harperova biochemie*. H & H. 871 s.

Silbernagl S., Lang F. 2010. *Color Atlas of Pathophysiology*. Georg Thieme Verlag KG. 433 s.

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. 187 s.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Struktura polynenasycených mastných kyselin ω -3 a ω -6 (převzato a upraveno z: http://che1.lf1.cuni.cz/html/Mastne_kyseliny_2sm.pdf).

Obr. 2: Metabolismus n-6 a n-3 PUFA, čísla uvedená pod názvy molekul udávají počet uhlíků a dvojných vazeb (převzato a upraveno z Schmitz a Ecker, 2008).

Obr. 3: Mechanismus působení n-3 PUFA jako prevence rakoviny a kardiovaskulárních nemocí (převzato a upraveno z Manson et al., 2012).

Obr. 4: Graf porovnávající konečné průměrné hmotnosti u jednotlivých diet.

Obr. 5: Průměrný denní přírůstek u jednotlivých diet.

Obr. 6: Zastoupení kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) v tukové a jaterní tkáni a jejich součty u jednotlivých diet.

Obr. 7: Plazmatická koncentrace adiponektinu u jednotlivých diet.

Obr. 8: Denzitometrická kvantifikace množství adiponektinu (vztaženo k β -aktinu) v epididymální tukové tkáni.

Obr. 9: Denzitometrická kvantifikace množství transkripčního faktoru aktivovaného proliferátory peroxizomů receptor gamma (PPAR- γ) v jaderné frakci jaterní tkáně (vztaženo k β -aktinu).

Obr. 10: Denzitometrická kvantifikace množství transkripčního faktoru aktivovaného proliferátory peroxizomů receptor gamma (PPAR- γ) v cytosolové frakci jaterní tkáně (vztaženo k β -aktinu).

Obr. 11: Denzitometrická kvantifikace množství transkripčního faktoru jaderného faktoru kappa B (NF- κ B) v jaderné frakci jaterní tkáně (vztaženo k β -aktinu).

Obr. 12: Kvantifikace prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α a protizánětlivého cytokinu IL-10 na základě absorbance.

Obr. 13: Srovnání plazmatické koncentrace transformujícího růstového faktoru β 1 (TGF- β 1) u jednotlivých diet.

Tab. 1: Procentuální obsah n-3 a n-6 PUFA z celkového množství mastných kyselin v olejích přidávaných do krmiva pokusných zvířat.

Tab. 2: Průměrné hodnoty hmotnosti a příjmu krmiva u jednotlivých diet.

9 SEZNAM ZKRATEK

AdipoR	adiponektinový receptor
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
ALA	α -linolenová kyselina
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
cDNA	komplementární DNA
COX	cyklooxygenáza
DGLA	dihomo- γ -linolenová kyselina
DHA	dokosahexaenová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	eikosapentaenová kyselina
GLA	γ -linolenová kyselina
GPR120	receptor 120 spřažený s G-proteinem
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonová kyselina
HNF	jaterní nukleární faktor
IL	interleukin
LA	linolová kyselina
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LOX	lipoxygenáza
LXR	jaterní X receptory
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
NPY	neuropeptid Y

PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PPAR	receptory aktivované peroxizomálními proliferátory
PUFA	polynenasyčené mastné kyseliny
RXR	retinoidní nukleární receptor X
SCAP	SREBP <i>cleavage-activity protein</i>
SDS	laurylsíran sodný
sICAM	rozpustná intercelulární adhezní molekula
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
TAK	TGF- β <i>activated kinase</i>
TGF- β 1	transformující růstový faktor beta 1
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>