

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Protizánětlivá aktivita mastných kyselin ze sardinek
a šprotů**

Diplomová práce

**Bc. Martina Vysoudilová
Výživa a potraviny**

Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Protizánětlivá aktivita mastných kyselin ze sardinek a šprotů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a konzultace během psaní diplomové práce i během práce v laboratoři a za odborné vedení práce.

Protizánětlivá aktivita mastných kyselin ze sardinek a šprotů

Souhrn

Řada potravin má pozitivní efekt na lidské zdraví. Mezi takové potraviny patří i mnozí vodní živočichové. Mezi ty se řadí také sardinky a šproty, které obsahují vysoké množství polynenasycených mastných kyselin, které mají vliv na lidské zdraví. Tyto mastné kyseliny mají schopnost zabraňovat vstupu virů do buněk a dále se replikovat. Současně mají vliv při řadě zánětlivých onemocnění, kdy jsou schopné inhibovat produkci zánětlivých markerů jako jsou oxid dusnatý (NO) a tumor nekrozní faktor (TNF).

Cílem této práce bylo stanovit vliv sardinek a šprotů v rozdílné kulinární úpravě na produkci NO a TNF na buněčné linii myších makrofágů RAW264.7.

Testovány byly sardinky a šproty bez tepelné úpravy, smažené, vařené, vařené v páře a pečené. Vzorky byly tráveny pomocí harmonizovaného statického modelu trávení INFOGEST 2.0, kdy postupně došlo k simulaci orální, gastrické a intestinální fáze trávení. Následně byly vzorky filtrovány přes PEF filtr o průměru 0,22 μm . Takto připravené vzorky byly pipetovány v koncentraci 20-0,009 % tráveniny do mikrotitrační destičky, kde byly již 1 h inkubovány buňky buněčné linie RAW 264.7. Současně byl do destičky přidán lipopolysacharid (LPS) v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ s 24 h inkubací. Následně došlo k odebrání 50 μl supernatantu, který byl smíchán s 50 μl Griesova činidla s následným měřením při 540 nm. Byla stanovena produkce NO. Následně byla destička centrifugována, zbytek supernatantu odstraněn a zamražen pro další testy a nahrazen tetrazol bromidem a destička byla kultivována 2 h. Následně byl tetrazol bromid odstraněn a nahrazen dimethylsufoxidem a destička měřena při 495 nm. Byla stanovena koncentrace, kdy dochází maximálně k 5% úmrtí buněk. Zamražený supernatant byl využit pro stanovení TNF- α pomocí komerčního testu.

Bylo zjištěno, že kromě smažených sardinek a šprotů mají testované vzorky toxický vliv na buňky až do koncentrace tráveniny 0,04 %. Smažené sardinky a šproty při vyšších koncentracích zvyšovaly produkci NO a jeho produkce byla vyšší i o 100 %. Při koncentraci tráveniny 0,04 % nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v produkci NO v porovnání s kontrolou. U produkce TNF- α bylo pouze u syrové sardinky zaznamenáno 8% snížení produkce TNF. Většina tepelných úprav naopak vedla k výraznému zvýšení produkce TNF v porovnání s kontrolou. Tepelná úprava u vzorků byla smažení, vaření, vaření v páře a pečení.

Můžeme říci, že hypotéza byla vyvrácena a mastné kyseliny z trávenin ryb mají negativní účinek na protizánětlivou aktivitu.

Klíčová slova: Cyklooxygenáza; interleukin; faktor nádorové nekrózy; lipopolysacharid; buněčné linie

Anti-inflammatory activity of fatty acids of sardines and sprats

Summary

Many of foods have a positive effect on human health, including many aquatic animals. These also include sardines and sprats, which contain high amounts polyunsaturated fatty acids that affect human health. These fatty acids have the ability to prevent cells from entering of viruses and their replication further. They also have an effect on number of inflammatory diseases with ability to inhibit production of inflammatory markers such as nitric oxide (NO) and tumour necrosis factor (TNF).

The aim of this thesis was to determine the effect of sardines and sprat in different culinary treatment on the production of NO and TNF on the mouse macrophage cell line RAW264.7.

Sardines and sprat were tested without heat treatment, fried, boiled, steamed and baked. These samples were digested using harmonized static digestion model INFOGEST 2.0, which gradually simulated the oral, gastric and intestinal phases of digestion. The samples were then filtered through a PEF filter with a diameter of 0.22 μm . Samples prepared this way were pipetted at a concentration of 20-0.009% chyme into a microtitre plate, where cells of RAW 264.7 cell line were incubated for 1 hour. At the same time, a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lipopolisaccharide (LPS) was added to the plate with 24 h incubation. Subsequently, 50 μl of supernatant was collected and mixed with 50 μl of Gries' reagent followed by measurements at 540 nm. Subsequently, the plate was centrifuged, the rest of the supernatant was removed and frozen for further tests and replaced with tetrazol bromide and the plate was cultivated for 2 h. Subsequently, tetrazole bromide was removed and replaced with dimethylsulfoxide and the plate measured at 495 nm. Concentration has been determined where maximally 5% of cell deaths occurred. The frozen supernatant was used to determine TNF- α by a commercial test.

Except for fried sardines and sprats, the tested samples were found to have a toxic effect on cells up to a concentration of chyme 0.04%. Fried samples of sardines and sprats increased NO production and its production was higher by 100%. At a concentration of 0.04%, there was no statistically significant difference in the production of NO in control treatment. TNF- α production showed an 8% reduction of TNF production in raw sardines. Conversely, most heat treatments have resulted in a significant increase in TNF production compared to controls. Heat treatment for the samples was frying, boiling, steaming and baking.

We can say that the hypothesis has been refuted, and fatty acids of fish chyme have a negative effect on anti-inflammatory activity.

Keywords: cyklooxygenase, interleukins, tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, cell lines

Obsah

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární rešerše.....	11
3.1	Lidská výživa.....	11
3.1.1	Bílkoviny	11
3.1.2	Sacharidy	13
3.1.3	Tuky.....	14
3.1.4	Trávení tuků	16
3.1.5	Tepelná stabilita omega-3 PUFA	17
3.2	Sardinky a šproty.....	18
3.3	Vliv polynenasycených mastných kyselin na lidské zdraví.....	19
3.3.1	Vliv omega-3 PUFA na obezitu	20
3.3.2	Zdraví kostí v souvislosti s omega-3 PUFA.....	20
3.3.3	Vliv PUFA na nádorová onemocnění	21
3.3.4	Kardiovaskulární onemocnění.....	22
3.3.5	Vliv omega-3 PUFA na záněty	24
3.3.6	Vliv omega-3 PUFA na nervovou soustavu	25
3.4	Protizánětlivá aktivita omega-3 PUFA	26
4	Metodika.....	29
4.1	Materiál	29
4.2	Metodika.....	29
4.2.1	Příprava vzorků	29
4.2.2	Trávení vzorků	29
4.2.3	Buněčná linie RAW264.7.....	30
4.2.4	Příprava mikrotitrační destičky	30
4.2.5	Stanovení produkce NO Griessovou reakcí	31
4.2.6	Stanovení toxicity pomocí MTT	31
4.2.7	Stanovení TNF- α	31
4.2.8	Statistické vyhodnocení	31
5	Výsledky	32
5.1	Produkce NO a toxicita	32
5.2	Produkce TNF- α	33
6	Diskuze.....	35
7	Závěr	37
8	Literatura	38

1 Úvod

V souvislosti s vypuknutím pandemie onemocnění SARS-CoV-2 v roce 2020 stoupl zájem o možná preventivní opatření proti virovým a dalším onemocněním, prostřednictvím potravin. Mezi potraviny, které mohou mít pozitivní vliv na lidské zdraví se řadí ryby bohaté na polynenasycené mastné kyseliny. K těmto zástupcům patří i sardinky a šproty, které představují bohatý zdroj polynenasycených mastných kyselin omega 3.

Tyto mastné kyseliny představují hlavní zdroj α -linolenové, eikosapentaenové a dokosahexaenové kyseliny. Ty mají schopnost chránit buňky před vstupem viru a jeho následnou replikací uvnitř buňky. Je známo, že mohou hrát roli i při zánětlivých reakcích v organismu, kdy jejich dlouhodobé podávání vede ke snížení hladin celé řady cytokinů jako jsou interleukiny, tumor nekrozní faktor a další.

Většina současných studií potvrzujících pozitivní vliv omega 3 na lidské zdraví pracuje výhradně s čistými mastnými kyselinami a nebere v potaz zdroje z potravy, a to zejména z ryb. Tyto zdroje jsou často tepelně zpracovány a procesy během tepelné úpravy mohou vést ke změně vlastností polynenasycených mastných kyselin a jejich schopnosti inhibovat produkci zánětlivých markerů, včetně různých cytokinů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Mastné kyseliny mají protizánětlivou aktivitu a jsou schopné inhibovat produkci prozánětlivých markerů.

Cílem práce je pomocí lidských buněčných linií stimulovaných lipopolysacharidem stanovit inhibici produkce interleukinů, faktorů nádorové nekrózy nebo oxidu dusnatého.

3 Literární rešerše

3.1 Lidská výživa

Vhodná výživa je hlavním zdrojem energie pro metabolické procesy v lidském těle a lze jí předcházet mnohým onemocněním. Obtíže způsobené nevhodnou stravou mohou mít mnoho podob a rozdílné původy a mohou ovlivnit jedince i vývoj následující generace. Mezi hlavní globální problémy způsobené neadekvátní výživou se řadí podvýživa, deficiencie mikronutrientů a obezita. S těmito problémy se lze setkat ve všech zemích i socioekonomických podmínkách. Přestože výskyt nadváhy a obezity v lidské populaci stále roste, opačný problém – podvýživa a deficit mikronutrientů stále přetrvává (FAO, 2022).

Nejčastější příčinou předčasného úmrtí ve vyspělých zemích jsou ischemické choroby srdeční, mrtvice a nádorová onemocnění. Některá tato onemocnění jsou doprovázena obezitou či zvýšenou hladinou cholesterolu, což opět odkazuje na nevhodnou stravu. Například nízký příjem ovoce a zeleniny byl zaznamenán v 31 % případů ICHS, 11 % mrtvic a 19 % případů gastrointestinálních nádorových onemocněních. V rozvíjejících se zemích představuje hlavní problém podvýživa, nedostatek mikronutrientů, bílkovin a celkový nedostatečný příjem energie (Eggersdorfer & Wyss 2018).

Povědomí o potravinové bezpečnosti a výzvě stále rostoucí světové populace podporují hledání udržitelných a ekologicky proveditelných vysoce výživných potravin, včetně zkoumání alternativních zdrojů bílkovin. To by mohlo vést k nahrazení tradičních živočišných bílkovin alternativními (Sa et al. 2020). Lidský mozek ke správnému fungování potřebuje dostatečné množství energie a živin. Makroživiny – sachridy, bílkoviny a tuky dodávají tělu glukózu, mastné kyseliny a aminokyseliny. Jejich příjem musí být vyvážený a optimální vzhledem ke zdravotnímu stavu a potřebám daného jedince. Podle WHO je doporučený příjem sacharidů 55-75 % z celkového energetického příjmu (CEP), bílkovin 10-15 % CEP a tuků 15-30 % CEP (Jakobsen & Overvad 2011). Stravovací návyky lidí se aktuálně přiklání ke stravě, ve které jsou běžné rafinované obiloviny, maso, přidané tuky a cukr a příjem rostlinných bílkovin a vlákniny je nízký (Kendall et al. 2010).

3.1.1 Bílkoviny

Bílkoviny hrají v lidském těle významnou roli díky svým funkcím – stavební, transportní a skladovací, enzymatická a imunitní. Jsou heterogenní ve funkcích i struktuře. Molekula bílkoviny může obsahovat hydrofobní i hydrofilní oblasti a odlišné vazby určující odlišnou strukturu a tím i funkci. Postranní řetězce se mohou lišit velikostí i nábojem.

Ve stravě se bílkoviny nachází v živočišných i rostlinných zdrojích, nicméně kvalita bílkovin v jednotlivých potravinách je rozdílná. Kvalita bílkovin v potravině závisí nejen na celkovém množství samotné bílkoviny, ale i na zastoupení aminokyselin a jejich stravitelnosti. Lidský metabolismus je schopen využít 20 aminokyselin, z čehož 9 jich je esenciálních – lidské tělo je nedokáže syntetizovat, a tak je nutné zajistit jejich příjem stravou. Jedná se o leucin, izoleucin, valin, methionin, lysin, fenylalanin, threonin, tryptofan a histidin, který se dříve považoval za esenciální pouze u dětí. Pro stanovení kvality bílkovinného zdroje lze použít rovnici určující skóre stravitelných esenciálních aminokyselin (DIAAS). Tato rovnice porovnává stravitelné esenciální aminokyseliny v daném vzorku vůči ideální referenční potravině. Čím vyšší je hodnota výsledného skóre, tím je bílkovina hodnotnější. Méně kvalitní

zdroje bílkovin je vhodné doplnit kvalitnějšími právě tak, aby žádná aminokyselina nabyla v nedostatku (Loveday 2019).

$$DIAAS = 100 \times \frac{mg \text{ EAA v } 1g \text{ testovaného vzorku}}{mg \text{ EAA v } 1g \text{ referenční potraviny}}$$

Doporučený příjem bílkovin pro zdravého dospělého člověka s minimální fyzickou aktivitou je v současné době 0,8 g bílkovin na kg tělesné hmotnosti za den. Pro splnění funkčních potřeb, jako je podpora a ochrana bílkovin kosterního svalstva a fyzické síly, se doporučuje příjem 1,0 g, 1,3 g a 1,6 g bílkovin na kg tělesné hmotnosti denně pro osoby s minimální, střední a intenzivní fyzickou aktivitou. Dlouhodobá konzumace bílkovin v dávce 2 g na kg tělesné hmotnosti denně je bezpečná pro zdravé dospělé osoby a tolerovatelná horní hranice je 3,5 g na kg tělesné hmotnosti za den pro dobře přizpůsobené subjekty. Chronický vysoký příjem bílkovin (>2 g na kg tělesné hmotnosti za den u dospělých) může vést k abnormalitám trávení, onemocnění ledvin a cév a je třeba se mu vyhnout. Množství a kvalita bílkovin jsou určujícími faktory jejich nutričních hodnot. Proto je adekvátní konzumace vysoce kvalitních bílkovin z živočišných produktů (např. libového masa a mléka) nezbytná pro optimální růst, vývoj a lidské zdraví. Rozložení denního příjmu bílkovin v průběhu dne také hraje roli. Rychlost syntézy bílkovin kosterního svalstva u zdravých dospělých je o 25% vyšší, když je příjem bílkovin rovnoměrně rozložen mezi snídaní, oběd a večeři, ve srovnání s případy, kdy je většina bílkovin konzumována při večeři navzdory stejnému dennímu příjmu bílkovin. Ideální lidská strava by se skládala z živočišných i rostlinných potravin ve vhodném množství a poměru, aby byl zajištěn příjem dostatečného množství a kvality bílkovin. Deficit bílkovin doprovází například snížení syntézy bílkovin a zvýšení proteolýzy kosterního svalstva, nízký sérový albumin, snížené koncentrace aminokyselin v plazmě, endokrinní nerovnováha, snížené hladiny inzulínu, zhoršené antioxidační reakce, zvýšený oxidační stres, zpomalený vývoj dětí a mladistvých, omezení nitroděložního růstu a mnoho dalších obtíží (Wu 2016). Za nejvýznamnější živočišné zdroje bílkovin lze považovat maso, především kuřecí, vařená vejce a mléko. Nejvíce vhodným rostlinným zdrojem bílkovin jsou obecně luštěniny, v čele například s ciznou, čočkou či hrachem, případně sojovým výrobkem – tofu. Z obilnin a výrobků z nich jsou nejvíce zastoupené v lidské dietě ovesné vločky, rýže a celozrný chléb, nicméně z hlediska obsahu bílkovin nejsou tyto potraviny atraktivní (Marinangeli & House 2017).

Tabulka 1: přehled DIASS v jednotlivých potravinách

Potravina	DIASS
Kuřecí maso	108
Mléko	114
Vejce	113
Cizrna	83
Čočka	65
Hrách	68
Tofu	52
Ovesné vločky	84
Rýže	57
Chléb	29

3.1.2 Sacharidy

Sacharidy jsou skupinou chemicky definovaných látek s řadou fyzikálních a fyziologických vlastností a přínosů pro zdraví. Stejně jako u ostatních makronutrientů je primární klasifikace dietních sacharidů založena na chemické struktuře – charakteru jednotlivých monomerů, stupni polymerace a typu vazby (α nebo β). Sacharidy se dělí na tři hlavní skupiny – monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Účinky sacharidů jsou spojeny s jejich primární chemickou strukturou a jsou modifikovány jejich fyzikálními vlastnostmi. Patří mezi ně rozpustnost ve vodě, hydratace, tvorba gelu, krystalický stav, reakce s jinými molekulami jako jsou bílkoviny, lipidy, agregace do složitých struktur v buněčných stěnách a jiných specializovaných buněčných tkáních. Klasifikace založená na chemické struktuře je nezbytná pro predikci vlastností a odhadu příjmu, ale neumožňuje definovat nutriční účinky, protože každá třída sacharidů má překrývající se fyziologické vlastnosti a účinky na zdraví (Cummings & Stephen 2007).

Sacharidy s různými fyzikálními formami, chemickými strukturami, velikostí částic a obsahem vlákniny vyvolávají odlišné plazmatické, glukózové a inzulínové odpovědi, tedy glykemický index (GI), který udává rychlost využití glukózy. Glykemická nálož (GL) vypovídá o absolutních hodnotách vzrůstu glykémie po konzumaci potravy a o očekávané stimulaci β buněk Lagerhansových ostrůvků slinivky břišní. Vypočítá se vynásobením GI potravy a jejího obsahu sacharidů v porci děleno stem (Ma et al. 2012).

$$GL = (GI \times \text{sacharidy v potravíně [g]})/100$$

Dietní doporučení obvykle navádějí k pravidelné konzumaci zeleniny, obilovin, luštěnin a ovoce, které jsou bohatým zdrojem vlákniny a komplexních polysacharidů a dalších živin podporujících zdraví (Reynolds et al. 2019). Sacharidy při příjmu méně než 40 % nebo více než 70 % z celkového energetického příjmu zvyšují riziko úmrtí. Optimální příjem sacharidů s nejnižším výskytem úmrtnosti činí 50–55 % z celkového energetického příjmu (Seidemann et al. 2018).

Trávení sacharidů začíná v ústech sekrecí slinné alfa-amylázy, která hydrolyzuje α -1,4 vazbu škrobu a přeměňuje ji na maltózu. Dalším enzymem účastnícím se trávení sacharidů je pankreatická amyláza v tenkém střevě, která tráví 60 % škrobů. Enzymy střevních epitelálních buněk degradují 6-uhlíkové sacharidy (Hauri et al. 1994). Těmito enzymy jsou laktáza pro degradaci laktózy na glukózu a galaktózu, sacharáza pro degradaci sacharózy na její složky glukózu a fruktózu a maltáza pro degradaci maltózy na dvě molekuly glukózy. Sacharidy s pěti uhlíky, jako je xylulóza, arabinóza, ribóza a ribulóza, snadno difundují do střevních absorpčních buněk a nepotřebují degradaci (Mac Donal et al. 2008). Absorpce šestiuhlíkatých sacharidů ze střevního epitelu probíhá dvěma způsoby: pasivními a aktivními transportními systémy. V pasivní difúzní formě vede fosforylace sacharidů (např. glukózy nebo galaktózy) ve střevních buňkách k jejich usnadněnému přenosu do oběhu. Glukóza-6-fosfát (G6P) a galaktóza-6-fosfát (Gal6P) jsou pak defosforylovány a vstupují do jater. V aktivní difúzní formě vstupují sacharidy využívající mobilní nosný protein spolu s pumpou sodík/draslík (Na^+/K^+) a proti gradientu spolu s iontem Na^+ do enterocytů. Proto Na^+/K^+ pumpa využívající ATP jako zdroj energie vyměňuje 3 Na^+ ionty s 3 K^+ ionty (Stevens et al. 1984). Galaktóza a fruktóza se v játrech přeměňují na glukózu. Glukóza se využívá v různých metabolických drahách pro stabilitu

krvního cukru v hypoglykemickém stavu, dodávání energie pro periferní tkáň, ukládání energie v játrech a kosterním svalstvu ve formě glykogenu, který může být využit při fyzické aktivitě (Fairchild et al. 2003), ukládání energie v tukové tkáni po přeměně na triglyceridy (TG, TAG, triacylglycerol nebo triacylglycerid) v případě přebytku glukózy a stabilita tělesné teploty (Dashty 2013).

3.1.3 Tuky

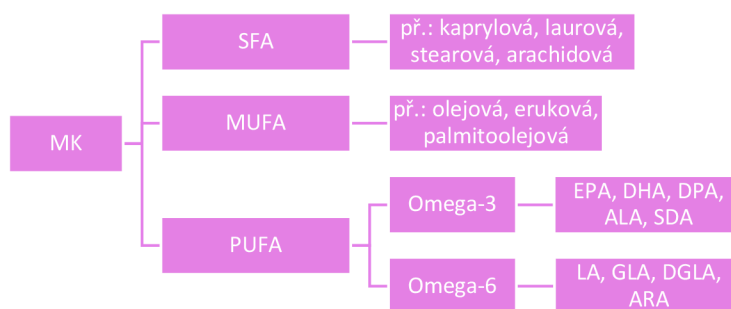
Lipidy jsou definovány jako sloučeniny, které jsou rozpustné v organických rozpouštědlech. Potravinové lipidy se skládají z mnoha sloučenin, včetně volných a esterifikovaných mastných kyselin (MK), sterolů (např. cholesterolu), karotenoidů a vitamínů rozpustných v tucích. Velká část lipidů v potravinách se vyskytuje ve formě triacylglycerolů (TAG) (Michalski et al. 2013). TAG se skládají z esterifikovaného glycerolu se třemi mastnými kyselinami, které obsahují karboxylovou kyselinu s alifatickým řetězcem. Délka řetězce je nejčastěji <22 uhlíků a většina MK má sudý počet atomů uhlíku. MK mohou být nasycené, což znamená, že jsou plně hydrogenované, nebo nenasycené, což znamená, že obsahují dvojnou vazbu. Dvojnou vazbu na přirozených nenasycených MK jsou typicky v konfiguraci cis. Polynenasycené mastné kyseliny obsahují více než jednu dvojnou vazbu, přičemž dvojnou vazbu jsou od sebe vzdáleny tři uhlíky (Vieira et al. 2015).

Mastné kyseliny jsou zdrojem energie a zároveň i součástí membrán. Vykazují biologické aktivity, které ovlivňují metabolismus, funkci buněk a reakci buněk a tkání na hormonální a jiné signály. Biologické aktivity mohou být seskupeny jako regulace struktury a funkce membrány, regulace intracelulárních signálních drah, aktivity transkripčního faktoru a genové exprese a regulace produkce bioaktivních lipidových mediátorů. Prostřednictvím těchto účinků ovlivňují mastné kyseliny lidské zdraví a riziko rozvoje onemocnění (Paes et al. 2019). Jsou diskutovány účinky nasycených, cis mononenasycených, omega-6 a omega-3 polynenasycených (PUFA) a trans mastných kyselin (TFA). Ačkoli je nejvíce diskutován zdravotní dopad mastných kyselin souvisejících s kardiovaskulárními chorobami, je v současné době jasné, že mastné kyseliny ovlivňují řadu dalších onemocnění, včetně metabolických onemocnění, jako je diabetes druhého typu, zánětlivá onemocnění a nádorová onemocnění. Nyní je však zřejmé, že v rámci každé třídy mastných kyselin mají různí zástupci různé reakce a účinky (Calder 2015).

Potravinové lipidy mohou být rozděleny na tuky a oleje, přičemž tuky jsou pevné při pokojové teplotě, oleje tekuté. Tuky mají obvykle vyšší množství nasycených mastných kyselin, které mají vyšší body tání než nenasycené MK. Pro člověka znamenají vysoký energetický příjem v podobě 4 kcal nebo 9 kJ na 1 g. Proto potraviny s vysokým obsahem tuků mají obvykle vysoký obsah kalorií, a mohou být spojeny s výskytem obezity (Vieira et al. 2015). Kromě již zmíněných funkcí jsou tuky v lidské stravě významné pro příjem vitamínů rozpustných v tucích. Vitamíny A, D, E a K jsou lipofilní sloučeniny, a proto se nazývají vitamíny rozpustné v tucích. Vzhledem k jejich lipofilitě jsou rozpuštěny a transportovány intracelulárními nosnými proteiny, aby splnily svou funkci a byly správně metabolizovány. Vitamíny rozpustné v tucích se dále dělí do čtyř skupin: vitamíny A (retinoly), D (cholecalciferoly), E (tokoferoly a tokotrienoly) a K (fylochinony a menachinony) (Kono & Arai 2015).

Rozdělení mastných kyselin

Mastné kyseliny je možno třídit podle několika kritérií. Kromě rozdělení podle fyzikálních vlastností popsaných výše mohou být mastné kyseliny rozděleny na základě počtu dvojných vazeb v uhlíkatém řetězci do tří kategorií; nasycené mastné kyseliny (SFA), které neobsahují žádnou dvojnou vazbu, mononenasyčené mastné kyseliny (dále MUFA z anglického monounsaturated fatty acid) s obsahem jedné dvojně vazby a polyneneasyčené mastné kyseliny s obsahem dvou a více dvojných vazeb. Dále lze mastné kyseliny rozdělit podle délky řetězce a následně i podle polohy dvojně vazby od koncového metylu na omega-3 (poslední dvojná vazba mezi třetím a čtvrtým uhlíkem) a omega-6 (poslední dvojná vazba mezi šestým a sedmým uhlíkem) mastné kyseliny (Saini & Keum 2018). Mezi omega-3 mastné kyseliny se řadí eikosapentaenová (EPA), dokosahexaenová (DHA), dokosapentaenová (DPA), α -linolenová (ALA) a stearidonová kyselina (SDA). (Shahidi & Ambigaipalan 2018) K omega-6 mastným kyselinám se řadí linoleová (LA), γ -linolenová (GLA), dihomogamma-linolenová (DGLA) a arachidonová kyselina (ARA) (Innes & Calder 2018).



Obrázek 1: Dělení mastných kyselin (Innes & Calder 2018; Saini & Keum 2018)

Zdroje omega-3 a omega-6 mastných kyselin

V lidské stravě se mastné kyseliny vyskytují běžně. ALA se nachází převážně ve lněném semínku (*Linum usitatissimum*, Carl Linné, 1753), vlašských ořechích (*Juglans regia L.*, Carl Linné, 1753), řepce (*Brassica napus*, Carl Linné, 1753) a listové zelenině. (Sharma & Mandal 2020) Dalším zdrojem jsou chia semínka (*Salvia hispanica*, Carl Linné, 1753) nebo semena hadince obecného (*Echium vulgare*, Carl Linné, 1753). EPA, DHA a DPA se nachází především v rybích olejích. Nejbohatším zdrojem je losos (*Salmo salar*, Carl Linné, 1758), sled' (*Clupea herengus*, Carl Linné, 1758) a makrela (*Scomber scombrus*, Carl Linné, 1758). (Shahidi & Ambigaipalan 2018) LA, ze které vychází další omega-6 mastné kyseliny, se vyskytuje v semenech slunečnice (*Helianthus annuus*, Carl Linné, 1753), kukuřice (*Zea mays*, Carl Linné, 1753), v sóje (*Glycine max*, Carl Linné, 1753), sezamu (*Sesamum indicum*, Carl Linné, 1753), mandlích (*Prunus dulcis*, D.A. Webb, 1967) a v menším množství také v řepce či v olivovém a kokosovém oleji (Silva et al. 2018).

Zastoupení mastných kyselin v tucích a olejích a jejich vhodné využití

Tuky a oleje využívané v potravinářství mají různé procentuální zastoupení omega-3 a omega-6 mastných kyselin. Zastoupení SFA, MUFA a omega-3 a omega-6 mastných kyselin v nejčastěji používaných olejích je následující: olivový olej 13 % SFA, 76 % MUFA, 10 %

omega-6 a <0,5 % omega-3, slunečnicový olej 13 % SFA, 27 % MUFA, 60 % omega-6 a <0,5 % omega-3, řepkový olej 4 % SFA, 62 % MUFA, 22 % omega-6 a 10 % omega-3, palmový olej 45 % SFA, 44 % MUFA, 10 % omega-6, <0,5 % omega-3. (Mishra & S.C.Manchanda 2012). Profil mastných kyselin ovlivňuje technologické vlastnosti daného tuku či oleje a tím určuje i vhodnost jeho využití.

Důležitým parametrem pro určení vhodného použití oleje či tuku je kouřový bod – teplota, při které dochází k rozkladu mastných kyselin na glycerol a volné mastné kyseliny a současně vzniku nežádoucích látek (aldehydy, ketony, dieny (Fullana et al. 2004)). Čím vyšší je kouřový bod, tím vyšší teplota může být zvolena při tepelné úpravě bez vzniku nežádoucích sloučenin (Rastogi et al. 2004). Kouřové body olejů jsou následující: panenský olivový olej 175 °C, řepkový olej 191 °C, slunečnicový olej 254 ° (Alzaa et al. 2018). Nejstabilnější olej při vyšších teplotách je řepkový (Katragadda et al. 2010; Alvarenga et al. 2018) a slunečnicový (Alvarenga et al. 2018).

Tabulka 2: Zastoupení MK v olejích (Mishra & S.C.Manchanda 2012)

Olej	Hlavní MK
Palmojádrový tuk	80-90 % SFA
Palmový tuk, kakaové máslo	SFA, olejová kys.
Olivový olej	Olejová kys.
Slunečnicový olej	Olejová, linolová kys.
Sójový, řepkový olej	Olejová, linolová, linolenová kys.

3.1.4 Trávení tuků

Trávení tuků je proces závislý na adsorpci lypolytických enzymů na povrch emulgovaných kapiček tuku. Emulgace probíhá již v žaludku pomocí žaludečních kyselin a následně v tenkém střevě žlučovými kyselinami a solemi (Porter et al. 2007). Charakteristickým rysem těchto enzymů (lipáz) je jejich specifická působení na nerozpustné emulgované substráty.

První fázi trávení lipidů probíhá tvorba emulzních kapiček, které poskytují vhodných povrch pro adsorpci lipázy. Mnoho tuků, které konzumujeme, pochází ze zpracovaných potravin, kde jsou již v emulgované formě. Významné množství tuku se však také získává v relativně neemulgované formě z kuchyňského oleje a viscerálního tuku z masa. Tělo má vysoce vyvinuté mechanismy, které usnadňují emulgaci takového tuku prostřednictvím mechanických procesů úst a žaludku. U dospělého člověka dochází k trávení tuků především v tenkém střevě, ale také ve značné míře v žaludku (Armand 2007). Trávení lipidů v žaludku je usnadněno žaludeční lipázou, což je lipáza stabilní v kyselém prostředí s aktivitou v širokém rozsahu pH. Lidská žaludeční lipáza (HGL) specificky hydrolyzuje volné mastné kyseliny a může představovat 5 až 30 % trávení lipidů. Produkty jsou volné mastné kyseliny a diglyceridy (Armand et al. 1999). Žaludeční lipáza má optimální aktivitu při pH ~ 5,4, což může vysvětlovat, proč se většina jejího působení vyskytuje během první hodiny žaludečního trávení, kdy je pH žaludku často stále zvýšené. Relativní význam lipolýzy žaludku hraje zásadní roli v úplném trávení lipidů v potravě, zejména pokud je buď vývojová (kojenci) nebo patologická pankreatická nedostatečnost (pankreatitida a cystická fibróza). Mastné kyseliny uvolněné během trávení v žaludku podporují lipolýzu pankreatu změnou mezifázového složení

emulgovaných lipidových kapiček a podporou emulgace tuku v žaludku. Mastné kyseliny spolu s dalšími povrchově aktivními digesty stabilizují kapičky vznikající při homogenizaci potravin při průchodu pylorem do dvanáctníku (Fave et al. 2004). Vzhledem k tomu, že trávenina přešla ze žaludku do tenkého střeva, trávení tuků pokračuje dvojím účinkem žaludeční lipázy a pankreatické lipázy. Pankreatická lipáza hydrolyzuje triacylglyceroly ve stravě, produkuje volné mastné kyseliny a 2-monoglyceridy. Pankreatická lipáza má široký rozsah aktivity pH (4,5–7,5) s optimální aktivitou kolem pH 6,5. Během trávení může dojít ke strukturálnímu přeskupení 2-monoglyceridů, což vede k úplné degradaci na glycerol a volné mastné kyseliny (Akesson et al. 1976).

Intestinální absorpce mastných kyselin je nejpřesněji definována jako přenos intraluminálních mastných kyselin do lymfy. Naproti tomu intestinální příjem mastných kyselin se týká jejich vstupu z lumenu do střevních absorpčních buněk. Jak lze odvodit z tohoto rozlišení, absorpce střevních mastných kyselin je vícestupňový proces, který je regulován více geny. Smíšené micely v lumenu tenkého střeva podporují absorpci mastných kyselin a cholesterolu tím, že usnadňují transport těchto lipidů přes nerozvířenou vodní vrstvu přiléhající k povrchu apikální membrány enterocytů. Samotná micelární částice neproniká buněčnou membránou. Spíše usnadňuje průchod přes difúzní bariéru, která se nachází na rozhraní střevního lumenu a membrány pro příjem enterocyty. Slizniční povlak střevní sliznice je také bariérou omezující difúzi, zejména proto, že molekuly cholesterolu mohou být před přenosem do enterocytů značně vázány na povrchové muciny (Wang et al. 2013).

3.1.5 Tepelná stabilita omega-3 PUFA

Tuky jsou náchylné na oxidaci, při které vznikají škodlivé sloučeniny a nežádoucí chutě (Ganesan et al. 2014). K oxidaci může dojít během nevhodného skladování nebo během tepelné přípravy potravin. PUFA jsou kvůli dvojně vazbě náchylnější k chemické modifikaci. V potravinách lze obecně zabránit oxidaci přidáním antioxidantů, čehož se využívá například při výrobě potravinových doplňků omega-3 (Wang et al. 2018), aby nedocházelo k nežádoucím procesům v tomto suplementu. V potravinách jsou omega-3 začleněny v podobě lipidových disperzí, tedy emulze oleje ve vodě. Právě fyzikální struktura této emulze je důvodem odlišného průběhu oxidace tuků a olejů.

Oxidace tuků způsobuje zvýšení peroxidového čísla. Například u šprotů se peroxidové číslo zvyšuje úměrně s teplotou. Po hodinovém zahřátí na 100 °C se množství DHA ve šprotech snížilo o 20 %, při 160 °C byl pokles DHA 45 % po 15 minutách a po hodině při stejné teplotě bylo snížení o 70 %. Ztráty EPA byly při stejných podmínkách nižší než 20 %. Při smažení lososa, makrely a sardinek vykázal nejvyšší stabilitu losos (Candela et al. 1998). Při přípravě lososa rozdílnými způsoby nebyl ovšem pozorován rozdíl ve změnách omega-3 (Al-Saghir et al. 2004) z čehož plyne, že rozdílné kulinářské úpravy mohou mít stejný efekt.

Ryby jsou často konzumovány až poté, co byly zamrazeny a dovezeny spotřebiteli. Při zamražení také může docházet ke změnám složení tuku (Sharma & Mandal 2020). Změny se týkají nárůstu množství volných mastných kyselin a vzrůstem peroxidového čísla (Aubourg 1999).

3.2 Sardinky a šproty

Jedním z mála zdrojů polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem je rybí tuk (Gamez-Meza et al. 1999). Skupina malých pelagických ryb je největší skupinou druhů chovaných na celosvětové úrovni. Významná část rych se zpracovává pro výrobu potravin a krmiva pro hospodářská zvířata, krmivo pro ryby a k výrobě rybího tuku a výživových doplňků bohatých na omega-3. Nutriční význam malých pelagických druhů ryb jako snadno stravitelných zdrojů bílkovin, bohatých na esenciální lipidy s mastnými kyselinami (EPA/DHA), esenciálními aminokyselinami, minerály a vitamíny, je dobře znám a zdokumentován. Z toho důvodu jsou malé pelagické druhy rych nutričně optimálním zdrojem lidské potravy (Isaacs, 2016).

Sardinka obecná je malý (10-25 cm), tučný, pelagický druh ryby z čeledi *Clupeidae*, který má velký komerční význam ve díky své výživové hodnotě a průmyslovému využití. V Jaderském moři má rybolov sardinek mimořádný význam. Důvodem jsou především chorvatská plavidla lovcí košelkovými nevodami, jejichž úlovky v současné době tvoří téměř 80 % celkového úlovku s roční vykládkou přes 50 tisíc tun (Carpi et al. 2017). S výjimkou zanedbatelného množství prodáváného v maloobchodě se sardinky obvykle dále zpracovávají. Zpracování do konzerv je jednou z nejdůležitějších a nejběžnějších metod konzervace sardinek. Jeden zpracovatelský závod spotřebuje až 12 tun suroviny pro denní produkci 65–68 tisíc konzervovaných sardinek, vyřadí až 30 % suroviny jako pevného odpadu. Především jde o hlavy, vnitřnosti a ocasy (Soldo et al. 2019). Nejcennějšími produkty získanými z vedlejších mořských produktů jsou rybí moučka a rybí tuk, které se zřídka používají k přímé lidské spotřebě. Jelikož se však tyto složky používají jako krmivo v zemědělství akvakultury, nepřímo přispívají k produkci potravin pro lidi. Vzhledem k růstu akvakultury by kromě stálé poptávky po vysoce kvalitních rybích olejích pro použití ve výše uvedených odvětvích mohlo používání vedlejších produktů rybolovu jako alternativního zdroje rybího tuku přispět k udržitelnosti rybolovu a produkci akvakultury (Ivanovs & Blumberga 2017).

Šproty jsou malé ryby z čeledi *Clupeidae* velikosti asi 10-20 cm. Žijí v hejnech a živí se zooplanktonem. Třetí sezóna se liší podle zeměpisné polohy, ale například v Baltském moři je to období od března do června. Množství ulovených šprotů se aktuálně pohybuje kolem 30 tisíc tun s tím, že postupně toto množství klesá. Je velmi důležité, aby ryby a rybí produkty byly v co nejvyšší kvalitě a případně s přidanou hodnotou. V baltských zemích jsou to sušené šproty nakládáné v koření. Takto zpracované šproty jsou vyrobeny z celých ryb, které byly vrstveny do sklenic s kořením a pokryty solankou. Šproty sušené kořením získají své charakteristické sensorické vlastnosti během zrání a jsou uváděni na trh po dvou týdnech zrání. Doba použitelnosti je od 2 do 3 měsíců podle určení výrobce (Timberg et al. 2014).

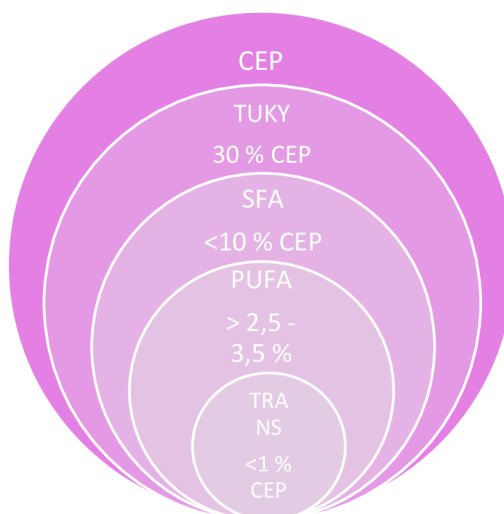
Ryby jsou obecně považovány za vhodný zdroj vysoce kvalitních bílkovin, zejména esenciálních aminokyselin (EAA), především lysinu a methioninu. Množství bílkovin v rybách se obvykle pohybuje mezi 16 a 21 %, nicméně existují i druhy, které obsahují pod 16 % bílkovin nebo naopak až 28 % bílkovin (Pilon et al. 2011). Obsah tuků v rybách se v jednotlivých druzích ryb značně liší. Obecně se pohybuje od 0,2 do 25 %, u sardinek i šprotů se obsah tuku pohybuje kolem 10 %. Zastoupení minerálů v rybách je průměrně od 0,4 do 1,5 %. Nejvíce zastoupené jsou železo, vápník, zinek, fosfor a selen. Selen a jód v mořských rybách mají zvláštní význam z hlediska výživy. Selen je nezbytný antioxidační stopový prvek. Jód je důležitý pro hormony tyroxin, který reguluje metabolismus těla a u dětí je potřebné pro růst

a duševní vývoj. Železo je důležité při syntéze hemoglobinu v červených krvinkách pro transport kyslíku do všech částí těla (Chandravanshi et al, 2019). Kvalitu rybiho masa ovlivňuje mnoho faktorů od krmiva až po způsob přepravy a zpracování. Obsah tuků je například poměrně snadno ovlivnitelný krmivem, jeho složením a systémem chovu (Sorensen 2012).

Rybí tuk může být extrahován z celých ryb nebo rybích vedlejších produktů chemickými nebo enzymatickými procesy, použitím některých nových, ekologických ekologických metod extrakce nebo tradičně v průmyslových odvětvích vařením, lisováním a odstředivou separací. Surové oleje obsahují některé nežádoucí sloučeniny, jako je vlhkost, pigmenty, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, minerály atd., které ovlivňují stabilitu, celkovou kvalitu a přijatelnost oleje spotřebiteli (Ivanovs & Blumberga 2017). Z tohoto důvodu je nutná rafinační úprava, obvykle zahrnující čtyři hlavní fáze: Degumming (oddělení fosfolipidů), neutralizace (snížení kyselosti), bělení (odstranění barevných materiálů) a deodorizace (odstranění nežádoucích pachových sloučenin). Úspěšná rafinace surového rybiho tuku bez ztráty polynenasycených mastných kyselin (PUFA) umožňuje jeho další uplatnění například jako doplněk stravy pro ty, kteří nekonzumují dostatečné množství ryb (Chakraborty & Joseph 2015).

3.3 Vliv polynenasycených mastných kyselin na lidské zdraví

Esenciální mastné kyseliny jsou ty, které si lidské tělo nedokáže vytvořit samo a jejich příjem je nutné zajistit prostřednictvím potravy. Z omega-3 mastných kyselin je esenciální ALA, která je prekursorem pro DHA a EPA. Ve skupině omega-6 mastných kyselin je esenciální LA a ARA (Sokola-Wysoczanska et al. 2014). Polynenasycené mastné kyseliny mají vliv na správné fungování mozku, srdce a další orgány (Arnoldussen & Kiliaan 2014). Jejich nedostatečný příjem či nevhodný poměr v dietě může vést k rozvoji civilizačních onemocnění a dalších zdravotních obtíží (Haast & Kiliaan 2015). Tradiční dieta obsahuje poměr PUFA omega-6: omega-3 přibližně 1:1, zatímco západní dieta postupně zvyšuje poměr na 15:1 (Berger et al. 2017) případně až 20:1. Důvodem je stále stoupající konzumace vysoce zpracovaných potravin a nevyvážená strava (Simopoulos 2016). Ideální poměr omega-6: omega-3 by měl být nanejvýš 5:1 (Ruprich 2019).



Obrázek 2: zastoupení tuku a mastných kyselin v celkovém energetickém příjmu (FAO 2010)

3.3.1 Vliv omega-3 PUFA na obezitu

Obezita je řazena mezi onemocnění se značnou morbiditou a se zvýšenou mortalitou. Je spjata s dalšími nemocemi jako je diabetes mellitus druhého typu, kardiovaskulární onemocnění, osteoartróza, porucha spánku či hypertenze (Lingvay et al. 2022). Metabolické změny spojené s těmito nemocemi představují metabolický syndrom, který je diagnostikován v případě, že se u daného jedince vyskytuje následujících pět symptomů: abdominální obezita, zvýšená hladina triglyceridů v krvi, snížená hladina HDL cholesterolu v krvi, vysoký krevní tlak a zvýšená hodnota krevní glykémie nalačno (Ford et al. 2002). Omega-3 mastné kyseliny, jakožto biologicky aktivní látky, mohou napomáhat v léčbě a prevenci jednotlivých faktorů metabolického syndromu a tím i řešit obezitu. Primárně léčba obezity spočívá ve změně stravování a životního stylu, nicméně lze využít i farmaceutika, chirurgická řešení a suplementaci potravinových doplňků (Albracht-Schulte et al. 2018).

Průměrný příjem omega-3 mastných kyselin u Eskymáků je 3 až 4 g/den, u Japonců 5 až 6 g/den zatímco Australané konzumují pouze 0,189 g/den, Evropané a Jihoameričané 0,25 g/den. Současně s vyšší hladinou omega-3 u Eskymáků a Japonců byl prokázán nižší výskyt metabolického syndromu a obezity (Meyer 2011).

Prevalence obezity se od roku 1970 dramaticky zvýšila. Podle National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) byla prevalence obezity v letech 2007–2008 33,8 %, což představuje nárůst o >100 % v letech 1976–1980 a 50% nárůst v letech 1988–1994. Od roku 2003–2004 se prevalence obezity u některých dospělých subpopulací stabilizuje. Morbidní obezita byla před rokem 1970 extrémně vzácná, ale od té doby začaly případy rychle stoupat bez známek zpomalení. Předpovědi trendů naznačují, že do roku 2030 bude 51 % populace obézních. Model odhaduje prevalenci obezity 42 % a prevalenci morbidní obezity 11 % (Finkelstein et al. 2012).

U lidí nemůže syntéza omega-3 PUFA probíhat endogenně, a proto jsou omega-3 PUFA, včetně ALA, EPA, DPA a DHA, důležitou složkou lidské stravy (Jeromson et al. 2015). Omega-3 PUFA hrají klíčovou roli v růstu a rozvoji a také při udržování optimálního zdravotního stavu ve všech věkových skupinách. Bylo prokázáno, že složení příjmu mastných kyselin ovlivňuje složení fosfolipidů v buněčné membráně. Tato akumulace omega-3 PUFA chrání před metabolickými chorobami, může změnit funkci a metabolismus buněčné membrány a snižuje oběhové zánětlivé markery. Předchozí výzkum také ukázal, že vyšší příjem omega-3 PUFA může být prospěšný při léčbě obezity, která je považována za chronický stav zánětu (Martinez-Fernandez et al. 2015). Naproti tomu omega-6 PUFA jsou prozánětlivé, přičemž vyšší příjem je spojen se zvýšeným výskytem obezity a metabolických onemocnění (Simopoulos 2016).

3.3.2 Zdraví kostí v souvislosti s omega-3 PUFA

V průběhu dětství a dospívání se množství kostní hmoty rapidně zvyšuje. Následuje období dospělosti, kdy je množství kostní hmoty relativně stálé až do začátku pozdního středního věku, kdy kostní hmota začne ubývat. Děje se tomu u mužů i žen, nicméně muži mají obvykle vyšší zastoupení minerálů v kostech než ženy, které se také setkávají s úbytkem minerálů v kostech kvůli menopauze. Tyto úbytky kostní hmoty způsobené věkem nemívají vážné zdravotní následky, pokud v dětství a dospívání probíhal růst kostí bez problémů.

Osteoporóza je onemocnění kostí, které se charakterizuje snižováním kostní hmoty neboli řídnutí kostí s hladinou T-skóre pod -2,5. To má za následek vyšší křehkost kostí a tím i větší náchylnost k frakturám. Předstupeň osteoporózy je osteopenie s T-skóre -1 až -2,5. V Evropské unii je 22 milionů žen a 5,5 milionů mužů, kterým byla diagnostikována osteoporóza. Příznaky jsou obvykle nespecifické a k odhalení onemocnění může docházet náhodně z rentgenu (Dolan & Sale 2019). V posledních letech došlo k významnému terapeutickému pokroku v léčbě osteoporózy, protože vědci získali větší pochopení morfologie kostí a základních mechanismů způsobujících osteoporózu. Na základě rozdílnosti původu vzniku lze osteoporózu rozdělit na primární a sekundární. Primární osteoporóza je často spojena s nedostatkem pohlavních hormonů v důsledku věku. Osteoporóza související s věkem je důsledkem neustálého zhoršování trabekul v kostech. Kromě toho snížení produkce estrogenu u žen po menopauze významně způsobuje zvýšení úbytku kostní hmoty. U mužů globulin vázající pohlavní hormony inaktivuje testosteron a estrogen při stárnutí, což může časem přispět ke snížení kostní denzity. Sekundární osteoporóza je způsobena několika chorobami dohromady anebo léky. Nemoci podílející se na osteoporóze často zahrnují mechanismy související s nerovnováhou vápníku, vitamínu D a pohlavních hormonů. Bylo například zjištěno, že Cushingův syndrom urychluje úbytek kostní hmoty nadměrnou produkcí glukokortikoidů. Navíc mnoho zánětlivých onemocnění, jako je revmatoidní artritida, může vyžadovat, aby pacient byl na dlouhodobé léčbě glukokortikoidy ovlivňující sekundární osteoporózu. Zejména glukokortikoidy jsou považovány za léky nejčastěji spojené s osteoporózou vyvolanou léky. Bylo zjištěno, že hustota kostí rychle klesá během tří až šesti měsíců od zahájení léčby glukokortikoidy. Příčiny sekundární osteoporózy se mohou lišit mezi pohlavími. U mužů je častěji spojováno s osteoporózou nadměrné užívání alkoholu, užívání glukokortikoidů a hypogonadismus. Například muži užívající androgen-deprivační terapii na rakovinu prostaty jsou vystaveni zvýšenému riziku osteoporózy. Bylo zjištěno, že osteoporóza u 32,4 % žen byla způsobena sekundárními příčinami, nejčastěji hyperkalciurií, malabsorpcí vápníku, hyperparatyreózou, nedostatkem vitamínu D, hypertyreózou, Cushingovou chorobou. Za zmínku stojí, že poruchy metabolismu vápníku a hyperparatyreózy přispěly k 78 % sekundárních příčin (Tu et al. 2018).

Bylo prokázáno, že omega-3 mastné kyseliny zlepšují zdraví kostí tím, že snižují osteoporózu tím, že inhibují aktivitu osteoklastů (Sun et al. 2003b). Zvýšená konzumace ryb nebo rybího oleje je spojována s ochranou kostí a zachovávání minerální hustoty kostí (Chen et al. 2010) a sníženým rizikem osteoporózy (Moon et al. 2012), zřejmě díky zvýšené absorpci vápníku a aktivaci osteoblastické aktivity zvýšením prokolagenu a osteokalcinu, což jsou markery mineralizace (Vanpapendorp et al. 1995).

3.3.3 Vliv PUFA na nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou závažným onemocněním rozšířeným po celém světě. Navzdory pokroku v léčbě nádorových onemocnění vede konvenční cytotoxická léčba k neuspokojivému dlouhodobému přežití, které souvisí především s rozvojem léčivové rezistence nádorových buněk a toxicitou vůči normálním buňkám. Omega-3 PUFA, EPA a DHA mohou vyvíjet antineoplastickou aktivitu indukci smrti buněk v lidských nádorových buňkách buď samostatně, nebo v kombinaci s konvenčními terapiemi. Omega-3 PUFA potenciálně zvyšují citlivost nádorových buněk na konvenční terapii, což může zlepšit jejich účinnost, zejména proti nádorovým onemocněním rezistentním na léčbu. Navíc, na rozdíl od tradičních terapií, omega-

3 PUFA zřejmě způsobují selektivní cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám s malou nebo žádnou toxicitou na normálních buňkách (D'Eliseo & Velotti 2016).

V roce 2022 se ve Spojených státech vyskytlo přes 1 910 000 nových případů nádorových onemocnění a 609 000 úmrtí, včetně přibližně 350 úmrtí denně na rakovinu plic, což je nádorové onemocnění s nejvyšší mortalitou. Pravděpodobnost diagnózy invazivního karcinomu je o něco vyšší u mužů (40,2 %) než u žen (38,5 %), což odráží očekávanou délku života i riziko nádorových onemocnění. Důvody vyššího rizika nádorového onemocnění u mužů nejsou plně pochopeny, ale pravděpodobně do značné míry odrážejí větší expozici rakovinotvorným environmentálním a biologickým faktorům, jako je kouření. Rozdíly v endogenních hormonech a imunitní funkce a odpovědi mohou také hrát roli. Karcinomy prostaty, plic a průdušek a kolorektální karcinomy představují téměř polovinu (48 %) všech případů výskytu nádorových onemocnění u mužů, přičemž samotná rakovina prostaty představuje 27 % diagnóz. U žen představuje rakovina prsu, rakovina plic a kolorektální karcinom 51% všech nových diagnóz, přičemž samotná rakovina prsu představuje téměř jednu třetinu (Siegel et al. 2022).

Odhaduje se, že v roce 2018 bylo v Evropě zaznamenáno 3,9 milionu nových případů nádorových onemocnění a 1,9 milionu úmrtí. Rakoviny ženského prsu (523 000 nových případů, 13 % všech případů nádorových onemocnění), kolorektu (500 000, 13 %), plic (470 000, 12 %) a prostaty (450 000, 12 %) byly nejčastějšími nádorovými onemocněními na kontinentu a dohromady představovaly téměř polovinu celkové zátěže nádorovými onemocněními. U mužů byla rakovina prostaty nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním téměř ve všech zemích severní a západní Evropy a rakovina plic byla nejčastěji diagnostikována ve většině východoevropských zemí. U žen je nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním ve všech evropských zemích rakovina prsu (The Cancer Atlas, 2022).

Tabulka 3: Přehled nových případů nádorových onemocnění a množství úmrtí na nádorová onemocnění (Siegel et al. 2022).

	Nové případy	Úmrtí
USA (2022)	1,9 mil	0,61 mil
Evropa (2018)	3,9 mil	1,9 mil

3.3.4 Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) zahrnují ischemickou chorobu srdeční, cévní mozkovou příhodu, srdeční selhání, onemocnění periferních tepen a řadu dalších srdečních a cévních onemocnění a představují hlavní příčinu celosvětové úmrtnosti a významně přispívají ke snížení kvality života (Yasin et al. 2019). Nejčastějšími příčinami vzniku kardiovaskulárních onemocnění jsou zvýšený krevní tlak, zvýšený cholesterol, diabetes, obezita, kouření, konzumace alkoholu a nevhodná životospráva zahrnující nedostatečnou konzumaci ovoce a zeleniny a celkově nevyváženou stravu a dále nedostatečnou fyzickou aktivitu. Vhodná vyvážená výživa případně suplementace omega-3 může snížit riziko vzniku KVO (Cortesi et al. 2021).

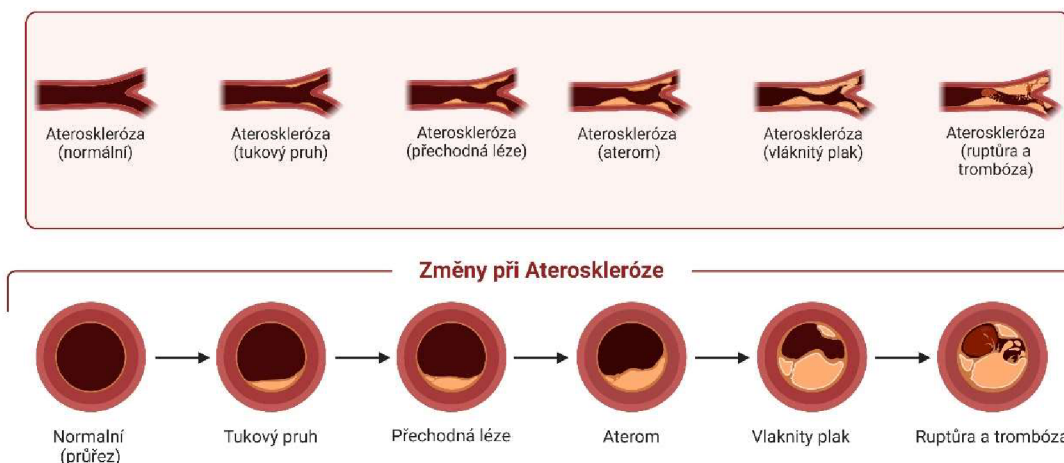
Příznivé účinky polynenasycených omega-3 mastných kyselin s dlouhým řetězcem jsou vyzdvihovány na základě důkazů, že suplementace omega-3 PUFA zvyšuje kardioprotekci

u pacientů s kardiovaskulárním rizikem nebo s kardiovaskulárním onemocněním (Innes & Calder 2020). Je známo, že KVO jsou mimo jiné důsledkem hyperreaktivity krevních destiček, jejich zvýšené agregace a dysfunkce endotelu (Incalza et al. 2018). Mechanismy účinku omega-3 PUFA na hemostázu jsou složité a jejich procesy nebyly plně objasněny (Manson et al. 2020). Hemostáza je v tomto kontextu definována jako vyvážený soubor obranných mechanismů organismu umožňujících mu udržovat krevní oběh a předcházet ztrátám krve v případě narušení integrity cév. Hlavními složkami hemostatického systému jsou cévní stěna (včetně endotelu), krevní destičky, koagulační a fibrinolytický systém. K prevenci KVO a udržování homeostázy napomáhají PUFA. Zvláštní kardioprotektivní vlastnosti jsou připisovány PUFA ze skupiny omega-3 kvůli jejich antiagregačním a protizánětlivým vlastnostem (Watanabe & Tatsuno 2020). Současné studie (Gao et al. 2013), (Abu Mweis et al. 2018), (Miller et al. 2014)) týkající se účinků omega-3 PUFA na hemostázu se zaměřují převážně na krevní destičky a endoteliální buňky. To je pochopitelné, protože podle buněčné teorie regulace hemostázy jsou jak krevní destičky, tak endoteliální buňky z velké části zodpovědné za patofyziologii kardiovaskulárních onemocnění. Proto je inhibice prokoagulační aktivity obou typů buněk považována za jeden z nejdůležitějších mechanismů kardioprotekce (Innes & Calder 2020). V případě pacientů s KVO se doporučuje zvýšit příjem EPA a DHA za účelem zlepšení klasické farmakologické léčby. K dosažení pozitivních účinků je nutné, aby příjem EPA a DHA dosáhl dostatečného množství buď potravou, nebo i suplementací (Osadnik & Jaworska 2016).

Omega-3 a omega-6 PUFA jsou složky fosfolipidů, které jsou složkami buněčných membrán. V důsledku katalytického působení fosfolipázy se tyto mastné kyseliny uvolňují z membrány a stávají se prekurzory eikosanoidů, jako jsou prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny nebo lipoxiny, s množstvím biologických účinků (Piper & Garelnabi 2020). Důležitým zástupcem omega-6 PUFA je LA, která je prekurzorem ARA a vyznačuje se prozánětlivými vlastnostmi. Naproti tomu ALA je hlavní mastná kyselina ze skupiny omega-3 jelikož je prekurzorem EPA, který je substrátem pro DHA. Tyto mastné kyseliny se vyznačují protizánětlivými vlastnostmi (Saini & Keum 2018). Metabolická dráha ARA cyklooxygenázou (COX) vede k produkci eikosanoidů. Syntéza proagregačního tromboxanu A₂ (TXA₂) probíhá v krevních destičkách, zatímco prostacyklin I₂ (PGI₂) se produkuje v endotelu s antagonistickým účinkem. Tromboxan A₃ (TXA₃) syntetizovaný v krevních destičkách vykazuje pouze mírnou proagregační aktivitu. Prostaglandin I₃ (PGI₃) produkovaný v endotelu má antiagregační vlastnosti. TXA₃ a PGI₃ jsou produkty metabolismu EPA (Endo & Arita 2016). Antiagregační účinky prostaglandinů, zejména PGI₂, které pocházejí z ARA, jsou výsledkem vazby na receptor spážený s G proteinem, což vede ke zvýšení intracelulární koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a snížení syntézy TXA₂ (Paes et al. 2019).

EPA a DHA mají inhibiční účinky na agregaci krevních destiček. LA a ALA soutěží o enzymy nezbytné pro další metabolické procesy. Vyšší příjem ALA v potravě ve srovnání s LA vede ke zvýšené syntéze metabolitů EPA a DHA, což vede k vyšší produkci TXA₃ než proagregační TXA₂. Možným účinkem je také inhibice cyklooxygenáz a přímý antagonistický vliv na receptor pro prostaglandin H₂-TXA₂. Prostaglandin H₂ je prekurzorem jiných prostaglandinů a tromboxanů. Krevní destičky hrají důležitou roli v hemostáze nejen kvůli aktivaci a agregaci, ale také proto, že se podílejí na tvorbě trombinu. Trombin je silný agonista krevních destiček, ale také se přímo podílí na tvorbě trombů. Nadměrná aktivace a agregace

krvních destiček může vést k nežádoucím kardiovaskulárním účinkům, jako je infarkt myokardu nebo ischemická cévní mozková příhoda. Omega-3 PUFA by mohly zlepšit konvenční terapii prostřednictvím regulace funkce krvních destiček (Adili et al. 2018). Příznivé účinky metabolitů ARA, EPA a DHA byly také pozorovány na endoteliální buňky. To je způsobeno především stimulací produkce oxidu dusnatého (NO). Omega-3 PUFA vykazují ochranný účinek na endotel jak syntézou NO, tak antioxidantními vlastnostmi. Celkově je to důležité pro prevenci a omezení rozvoje aterosklerózy a v důsledku toho pro prevenci infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhody (Yamagata 2020).



Obrázek 3: Ukládání tuku v cévních stěnách vedoucí k rozvoji aterosklerózy

3.3.5 Vliv omega-3 PUFA na záněty

Zánět je součástí běžného obranného mechanismu hostitele, který poskytuje ochranu před infekcemi, při poranění nebo při zvýšeném stresu. Zánět iniciuje potlačování patogenů a podílí se na procesech vedoucích k opravě tkání, což napomáhá k obnově a udržení homeostázy na infikovaných nebo poškozených místech. Zánětlivá odpověď zahrnuje interakce mezi mnoha typy buněk a produkci a odpovědi na řadu chemických mediátorů. Tyto mediátory jsou škodlivé pro patogeny, ale mohou také způsobit poškození hostitelských tkání (Calder 2013). Mezi běžné příznaky zánětu se řadí zarudnutí, otok, zvýšená teplota nebo teplo v daném místě, bolest a ztráta funkce daného místa. Tyto příznaky způsobuje náhlý příliv buněk do místa zánětu. Zánětlivost lze rozdělit do dvou typů: akutní a chronický zánět. Akutní zánět je rychlá reakce v časném stádiu zánětu a obvykle trvá několik minut až několik dní. V takovém případě je na místě, aby hostitel zahájil proces hojení a podpořil obnovu tkání. V případě, že nedojde k vyřešení poškození tkání během několika dní, tedy v rámci hojení akutního zánětu, postupuje zánět do chronické fáze. Ta může trvat týdny, měsíce, nebo i roky a v organismu tím dochází k poškození tkání a omezení jejich funkcí (Furman et al. 2019). Záněty přispívají k rozvoji mnohých onemocnění. Na základě tohoto zjištění jsou vyvíjeny léky i přírodní produkty rostlinného, živočišného i mikrobiálního původu. Přírodní produkty vykazují jedinečnou chemickou i biologickou rozmanitost a jsou méně toxické než synteticky vyráběné preparáty (Wang et al. 2021).

Jedním z přírodních zdrojů látek ovlivňující zánětlivost jsou mastné kyseliny obsažené v rybách, konkrétně polynenasycené mastné kyseliny: EPA a DHA. Polynenasycené mastné kyseliny mohou ovlivnit zánětlivý proces různými způsoby. PUFA mohou na zánětlivé buňky

působit přímo prostřednictvím povrchových nebo intracelulárních receptorů mastných kyselin, mohou být oxidovány (enzymaticky nebo neenzymaticky) na složitější lipidy včetně fosfolipidů buněčné membrány nebo LDL. Dále mohou být PUFA začleněny do fosfolipidů zánětlivých buněčných membrán, kde hrají roli při zajišťování vhodného prostředí pro funkci membránových proteinů a udržování uspořádání membrán (Yaqoob 2009). Membránové fosfolipidy jsou substráty pro vznik druhých posílů jako je diacylglycerol, přičemž složení mastných kyselin této molekuly může ovlivnit jejich aktivitu (Kumar et al. 2019). Kromě toho jsou membránové fosfolipidy substráty pro intracelulární uvolňování neesterifikovaných PUFA a uvolněné PUFA mohou působit jako signální molekuly, ligandy nebo prekurzory ligandů pro transkripční faktory nebo prekurzory pro biosyntézu lipidových mediátorů, které se podílejí na regulaci mnoha buněčných a tkáňových odpovědí, včetně zánětu a imunitních odpovědí. Změny ve složení membránových mastných kyselin mohou ovlivnit funkci buněk účastnících se zánětu prostřednictvím změny fyzikálních vlastností membrány, účinky na buněčné signální dráhy modifikací exprese nebo aktivity membránových receptorů, což vede ke změně aktivity transkripčního faktoru a změnám v expresi genů. Změny mohou nastat i ve struktuře produkovaných lipidových mediátorů (Al-Khalafah 2020).

Po zvýšeném příjmu omega-3 PUFA z mořských ryb v potravě se zvyšuje jejich koncentrace v komplexních lipidech v krevním řečišti a stejně tak i v membránových fosfolipidech buněk a tkání. Zároveň dochází k malému zvýšení koncentrace omega-3 v polu neesterifikovaných mastných kyselin. Kromě účinků na zánět zprostředkovaných změnami ve struktuře lipidů a dalších produkovaných lipidových mediátorů bylo také prokázáno, že mořské omega-3 PUFA mění produkci zánětlivých proteinů včetně chemokinů, cytokinů, růstových faktorů a matricových proteáz. Tento účinek může být zprostředkován změněnou aktivací klíčových transkripčních faktorů, které se podílejí na regulaci exprese zánětlivých genů. Rybí olej, respektive EPA a DHA inhibují produkci IL-6 lidskými endoteliálními buňkami a produkci TNF- α indukované endotoxiny kultivovanými monocyty (Lo et al. 1999). Omega-3 PUFA tedy v léčbě zánětu přispívají následujícími způsoby: snížení produkce eikosanoidních mediátorů z ARA, z nichž mnohé mají prozánětlivé role, zvyšování produkce protizánětlivých eikosanoidů z EPA a DHA, snížení chemotaktické odpovědi leukocytů, snižování exprese adhezních molekul na leukocytech a endoteliálních buňkách i snižování mezibuněčných adhezních interakcí, snižování produkce prozánětlivých cytokinů a dalších prozánětlivých bílkovin. Role mořských omega-3 PUFA při formování a regulaci zánětlivých procesů a reakcí naznačuje, že úroveň expozice těmto mastným kyselinám může být důležitá při určování vývoje a závažnosti zánětlivých onemocnění. Z toho důvodu se pacientům se zánětlivými onemocněními doporučuje suplementace omega-3 PUFA (Moeinzadeh et al. 2016).

3.3.6 Vliv omega-3 PUFA na nervovou soustavu

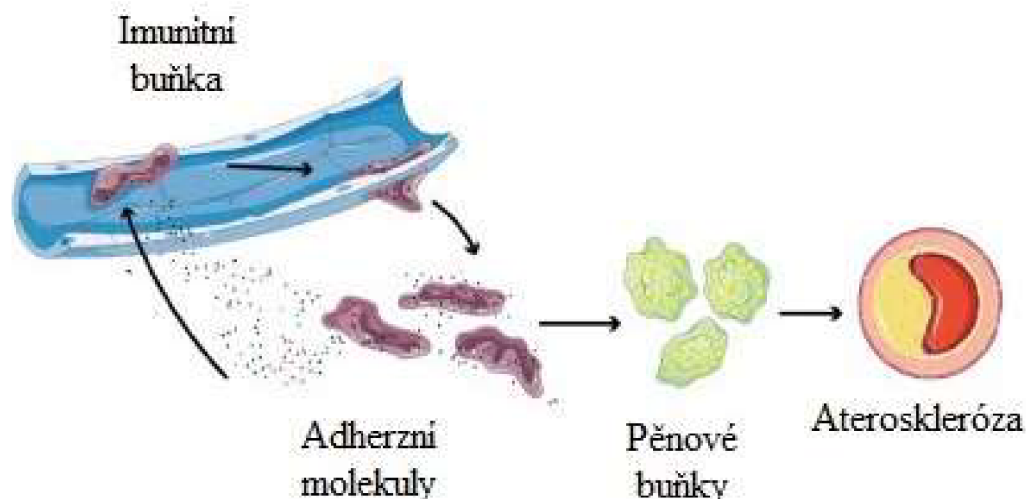
Lipidy představují přibližně 50 % až 70 % suché hmotnosti mozku (Wheeler et al. 2008). PUFA, z nichž nejhojnější jsou DHA a AA, představují přibližně 20% hmotnosti mozku. PUFA je součástí z 80 % celkových membránových fosfolipidů (Salem et al. 2001). Ovlivňují mozkové funkce tím, že mění biofyzikální vlastnosti buněčných membrán. Změny v lipidovém prostředí fosfolipidové dvojvrstvy vedou k funkčním změnám aktivity receptorů a dalších membránových proteinů. PUFA se podílejí na udržování normální struktury a funkce membrány a hrají klíčovou roli ve vývoji mozku (Delgado-Noguera et al. 2015). Dále AA,

DHA a jejich metabolity působí jako intracelulární druzí poslové a moduluji různé mozkové procesy, jako je transkripce genů, neurotransmise a neurozáněť. U hlodavců může DHA ovlivnit plasticitu a poznávání mozku zvýšením hipokampálních hladin neurotrofického faktoru odvozeného z mozku a metabolickými účinky, jako je stimulace využití glukózy a mitochondriální funkce, stejně jako snížení oxidačního stresu (Flachs et al. 2005). Kromě toho mohou diety, které jsou bohaté na omega-3 PUFA pomoci upregulovat geny, které se podílejí na udržování synaptické funkce a plasticity u hlodavců a zlepšit kognitivní funkce u lidí (Wu et al. 2007).

Omega-3 PUFA jsou nezbytné pro růst a vývoj centrálního nervového systému během těhotenství i dětství a následně pro optimální fungování mozku dospělých jedinců. Proto je dostatečný dietní přísun těchto sloučenin nezbytný (Kris-Etherton et al. 2009). Konzumace ryb, respektive zvýšený příjem omega-3 má pozitivní vliv při léčbě depresivních poruch a poruch bipolárního spektra a jejich nedostatek může naopak tato onemocnění rozvíjet (McNamara & Almeida 2019). Dalšími příznaky deficitu omega-3 může být i rozvoj ADHD (Lange et al. 2014), schizofrenie, demence (Glen et al. 1994) či autismu (Baio et al. 2018). Deficit omega-3 PUFA se projevuje nejčastěji depresi (Malhi & Mann 2018).

3.4 Protizánětlivá aktivita omega-3 PUFA

Cévní systém zajišťuje přívod krve do životně důležitých orgánů člověka a skládá se hlavně ze tří vrstev. Luminální strana krevních cév je endoteliální vrstva, která má více rolí při udržování lidského těla v homeostázi udržováním stabilního protizánětlivého, antikoagulačního a antiadhezivního stavu a řízením výměny mezi cirkulujícími krevními složkami a buňkami (Rubanyi 1993). Endoteliální buňky také spolupracují s imunitními buňkami při regulaci lokálního a systémového zánětu. Endoteliální i imunitní buňky mohou být aktivovány lipopolysacharidem (LPS) a tumor nekrotizujícím faktorem alfa ($TNF\alpha$) a vést k dysfunkci endoteliálních a imunitních buněk. Endoteliální dysfunkce vyvolaná endogenními a vnějšími podněty účinně vyvolá systémový stav zánětu a dalších imunitních odpovědí zvýšením exprese a produkce prozánětlivých mediátorů, adhezních molekul a nadměrnou adhezí a migrací imunitních buněk (Iantorno et al. 2014). Adheze imunitních buněk k endoteliálním buňkám je zprostředkována adhezními molekulami exprimovanými na imunitních buňkách a endoteliálních buňkách, např. P-, E- a L-seguiny, β 1- a β 2-intergriny, mezibuněčná adhezní molekula-1 (ICAM-1), adhezní molekula cévních buněk-1 (VCAM-1) a chemokiny, např. monocytární chemo-atraktanční protein-1 (MCP-1) (Mestas & Ley 2008). Odvádění monocytů do endoteliální vrstvy usnadňuje transmigraci do míst léze, kde se monocyty diferencují na makrofágy, které se po vychytávání lipidů stávají pěníými buňkami, což vede k rozvoji aterosklerózy (Hilgendorf et al. 2015). Navíc přeměněné imunitní buňky zhoršují zánětlivé odpovědi tím, že produkují více cytokinů, čímž vytvářejí nepřetržitý cyklus mezi endoteliálními a imunitními buňkami. Nadměrná produkce cytokinů a adheze imunitních buněk k místům léze jsou dva důležité přispěvatele k rozvoji zánětlivých onemocnění, včetně aterosklerózy a sepse. Endogenní cytokiny produkované endoteliálními a/nebo imunitními buňkami zvyšují zánětlivou odpověď a iniciují poškození tkání. Hladiny $TNF\alpha$, interleukinu-6 (IL-6) a zvýšená koncentrace NO jsou považovány za diagnostické markery u zánětlivých onemocnění (Czepiel et al. 2014).



Obrázek 4: Vznik pěných buněk

Tabulka 4: Shrnutí protizánětlivých a prozánětlivých markerů

Markery ovlivňující zánětlivost	
Prozánětlivé markery	IL-6, IL-8, IL-17, IL-20, IFN- γ , TNF- α
Protizánětlivé markery	IL-10, NKG2D, Tregs, TGF- β

Imunitní systém chrání hostitele před patogeny vylučováním zánětlivých cytokinů a zprostředkováním zneškodnění patogenů. Nadměrná produkce cytokinů však povede k systémovému zánětu a patologickým onemocněním. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) tak modulují zánět regulací produkce cytokinů imunitních buněk. Například butyrát a propionát snižují expresi TNF α indukované LPS a syntázy oxidu dusnatého (NOS) v monocitech. Tyto účinky jsou zprostředkovány aktivací receptorů volných mastných kyselin typu 2 (FFA2) a typu 3 (FFA3) a receptor spřažený s G proteinem 109A (GPR109A) a inhibicí histonových deacetyláz (HDAC) (Campos-Perez & Martinez-Lopez 2021). Prostřednictvím tohoto mechanismu by mohly omega-3 mastné kyseliny z mořských ryb snížit expresi adhezivních molekul a snížit adhezivní interakci mezi leukocyty a endotelem. Aktivovaný NF κ B indukuje expresi zánětlivého genu cytokinů. V souladu se sníženou aktivací NF κ B po expozici EPA a DHA je pozorováno, že tyto mastné kyseliny snižují LPS stimulovanou produkci IL-6 a IL-8 kultivovanými lidskými endoteliálními buňkami a EPA snižuje produkci LPS-indukovaného faktoru nádorové nekrózy (TNF)- α kultivovanými monocity (Yates et al. 2011).

Společně mohou výše jmenované protizánětlivé účinky přispět k anti-aterogenním účinkům mořských omega-3 PUFA, protože zahájení a progresse tohoto aterosklerotického plaku zahrnuje chemotaxi leukocytů, mezibuněčné adhezivní interakce a produkci zánětlivých mediátorů včetně cytokinů (Rees et al. 2006). Bylo prokázáno, že mořské omega-3 PUFA snižují riziko kardiovaskulárních příhod (Yokoyama et al. 2007), včetně náhlé srdeční smrti (Friedman et al. 2013). Protizánětlivé účinky mořských omega-3 PUFA mohou hrát klíčovou roli v těchto účincích. Mnohé z mechanismů ovlivňující zánětlivý proces jsou zprostředkovány nebo alespoň spojeny se změnami ve složení mastných kyselin v buněčných membránách. Změny v těchto složeních mohou modifikovat tekutost membrány, buněčnou signalizaci

vedoucí ke změně genové exprese a vzorec produkce lipidového mediátoru. Lidské zánětlivé buňky jsou typicky bohaté na omega-6 mastné kyseliny, ale obsah ARA a omega-3 mastných kyselin EPA a DHA může být změněn perorálním podáním EPA a DHA (Thies et al. 2003). Eikosanoidy produkované pomocí ARA hrají roli v průběhu zánětu. EPA také vede ke vzniku eikosanoidů a ty jsou obvykle biologicky slabší než eikosanoidy odvozené od ARA. EPA a DHA dávají vzniknout produktům, které jsou protizánětlivé a zánět odstraňující. Zvýšený obsah membrán EPA a DHA má za následek změnu struktury produkce eikosanoidů a pravděpodobně také resolvinů, i když ty nejsou v lidském kontextu dobře zkoumány. Změna složení mastných kyselin zánětlivých buněk také ovlivňuje produkci peptidových mediátorů zánětu. Složení mastných kyselin lidských zánětlivých buněk tedy ovlivňuje jejich funkci; obsah ARA, EPA a DHA se zdá být obzvláště důležitý (Calder 2012).

4 Metodika

4.1 Materiál

Pro testování protizánětlivé aktivity mastných kyselin sardinek (*Sardina pilchardus*) a šprotů (*Sprattus sprattus*) byla použita buněčná linie myších makrofágů RAW264.7 Kultivační medium RPMI 1640 (SigmaAldrich), fetální serum (Fetal bovine serum – FBS) (Biowest), neesenciální aminokyseliny (VWR) glukóza, Griesovo činidlo (SigmaAldrich). NaNO₂ (Lachner).

Složení kultivačního media: RPMI 1640 mediu obsahujícím 10 % FBS, 5 % neesenciálních aminokyselin, 10 % roztoku glukózy, 5 % ZELL Shield (BioConsult).

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava vzorků

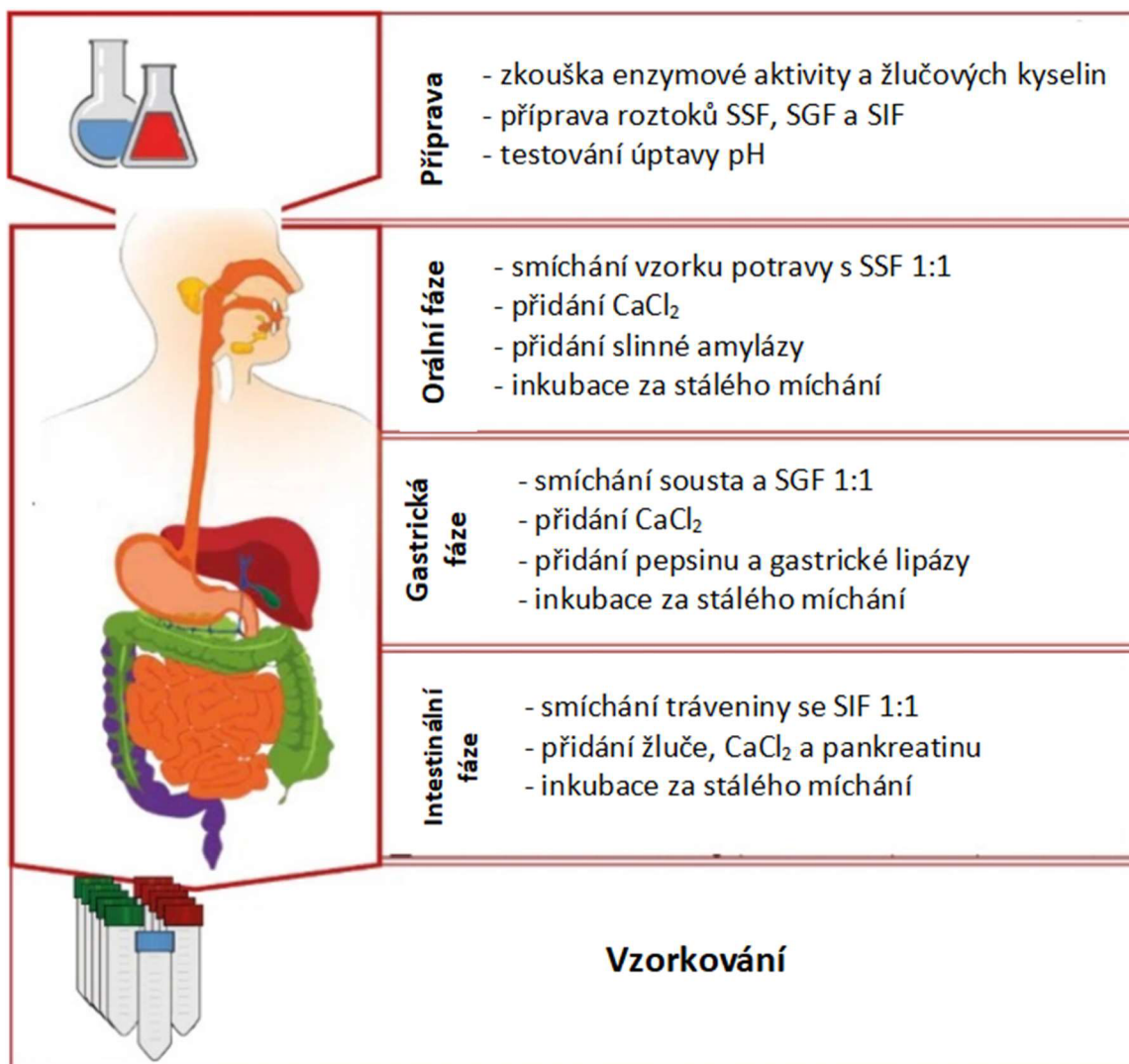
Sardinky a šproty byly zakoupeny v Polské tržní síti a připraveny na fakultě potravinářských technologií Zemědělské univerzity v Krakově. Vzorky byly nejprve kulinárně upraveny vařením, spařením, pečením a smažením, přičemž 1 vzorek od každého druhu ryby zůstal tepelně neopracován. Vzorky byly následně lyofilizovány a dopraveny na ČZU pro další analýzu.

4.2.2 Trávení vzorků

Rozemleté vzorky byly tráveny podle statického modelu trávení INFOGEST 2.0 Brodtkorb et al. (2019). Bylo naváženo 5 g vzorků, které postupně byly podrobeny orální, gastrické a intestinální fázi trávení.

V orální fázi došlo ke smíchání vzorku se slinnými šťávami s konečnou aktivitou amylázy 75 U/ml a v poměru 1:1 se vzorkem a při 37 °C za stálého míchání 2 minuty byly vzorky inkubovány. Ve žaludeční fázi byly smíchány se zásobním roztokem CaCl₂(H₂O)₂, pepsinem (2000 U/ml v trávicí směsi), žaludeční lipázou (60 U/ml v trávicí směsi) a destilovanou vodou v poměru 1:1. Pomocí HCL bylo pH upraveno na hodnotu 3 a vzorek byl inkubován při 37 °C po dobu 2 h za stálého míchání. V intestinální fázi došlo ke smíchání tráveniny v poměru 1:1 se zásobním roztokem žlučových solí (10 mmol ve výsledné směsi) za 30 minutového inkubování při 37 °C. Následně bylo ke směsi přidáno CaCl₂(H₂O)₂, pankreatin (pro dosažení aktivity trypsinu 100 U/ml) a pankreatická lipáza (2000 U/ml ve výsledné směsi). Takto připravené vzorky byly opětovně doplněny do poměru 1:1, upraveny roztokem NaOH na pH 7 a inkubovány za stálého míchání při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin.

Po trávení byly vzorky centrifugovány a byl odebrán supernatant, který byl následně filtrován přes stříkačkové mikrofiltry o průměru 0,2 μm do sterilních vialek. Následně byly vzorky zamrazeny na – 80 °C až do doby dalšího testování.



Obrázek 5: Schéma trávení vzorků

4.2.3 Buněčná linie RAW264.7

Po rozmražení byly buněčné linie RAW264.7 kultivovány v kompletním mediu RPMI se suplementy. Po 2 dnech a při 80% konfluenci byly makrofágy mechanicky sklizeny, centrifugovány po dobu 10 minut při $170 \times g$. Následně byl odstraněn supernatant a buňky byly rozředěny v čerstvém kompletním mediu. Objem 1×10^6 byl naočkován do láhve společně s 10 ml kompletního media a ponechán ve vlhčeném CO₂ inkubátoru a při teplotě 37 °C inkubován 48 h do dalšího sklizení.

4.2.4 Příprava mikrotitrační destičky

Zbytek buněčné suspenze z předchozího kroku byl naředěn na koncentraci $2,5 \times 10^5$ a napipetován do 96 jamkové mikrotitrační destičky v objemu 100 µl. Takto připravená destička se nechala inkubovat 2 h v CO₂ inkubátoru za standartních podmínek. Následně byly přidány testované tráveniny jednotlivých vzorků v koncentraci 20-0,009% tráveniny a směs čistých trávicích enzymů pro kontrolu. Následně do destičky bylo přidáno LPS v koncentraci 1 µg/ml

a jako negativní kontrola se ponechaly buňky bez přídavku LPS. Společně se vzorky a LPS je celkový objem jamky 200 μ l. Takto připravená destička se nechá inkubovat 24 h.

4.2.5 Stanovení produkce NO Griessovou reakcí

Po 24 h inkubaci byla destička centrifugována po dobu 5 minut při $170 \times g$. Poté je z každé jamky přeneseno 50 μ l supernatantu do nové destičky a následně přidáno 50 μ l Griessova činidla. Následně byla destička inkubována 10 minut při 37 °C. Následně byla měřena absorbance na čtečce mikrotitračních destiček INFINITE M200 (tecan, Švýcarsko) při 540 nm. Kalibrační přímka byla získána z roztoku NaNO₂ v rozsahu koncentrací 125-8 μ M/ml. Koncentrace NO u jednotlivých vzorků byla stanovena lineární regresí.

4.2.6 Stanovení toxicity pomocí MTT

Po odebrání supernatantu po skončení inkubace bylo do jamek přidáno MTT v koncentraci 1 mg/ml rozpuštěného v RPMI mediu. Destička byla inkubována po dobu 2 h. Následně bylo MTT odstraněno a nahrazeno dimethylsulfoxidem. Vzniklý produkt byl měřen na čtečce mikrotitračních destiček při vlnové délce 495 nm. Následně byla pomocí programu Magelan stanovena hodnota IC₅, kdy přeživalo 95 % buněk. Poté byla stanovena jedna koncentrace, která byla použita pro následné testování a vyhodnocování výsledků.

4.2.7 Stanovení TNF- α

Ke stanovení TNF- α byl využit komerční ELISA kit ENZO (ADI-900-047) na stanovení myši TNF- α dle návodu výrobce. Vzorky byly připraveny v rámci stanovení NO a odebrány po 24 h inkubaci z mikrotitrační destičky. Odebraný vzorek byl následně zamražen při -80 °C až do vlastní analýzy. V den testování byly všechny potřebné roztoky zahřáty na pokojovou teplotu společně se vzorky. Následně bylo do příslušných stripů v destičce přidáno 50 μ l standardů nebo vzorků, následně bylo přidáno 50 μ l ředícího pufu. Destička byla uzavřena a inkubována po dobu 2 h na orbitální třepačce s 250 otáčkami za minutu, při pokojové teplotě. Následně byl obsah jamek odstraněn a bylo přidáno 300 μ l promývacího roztoku, tento postup byl opakován 4 \times . Následně do prázdných jamek bylo přidáno 50 μ l protilátek a opět inkubováno na orbitální třepačce 2 h. Následovalo promývání jako předchozím kroce. Následně bylo přidáno 50 μ l konjugátu a 30 minut inkubováno na třepačce. Po inkubaci opět následovalo zopakování promývání destičky. A následně přidáno 50 μ l substrátového roztoku s 30 min. inkubací. Po inkubaci bylo do jamky přidáno 50 μ l zastavovacího roztoku. Destička byla měřena na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 při 450 nm, s korekcí při 570 a 590 nm. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí MS Excel.

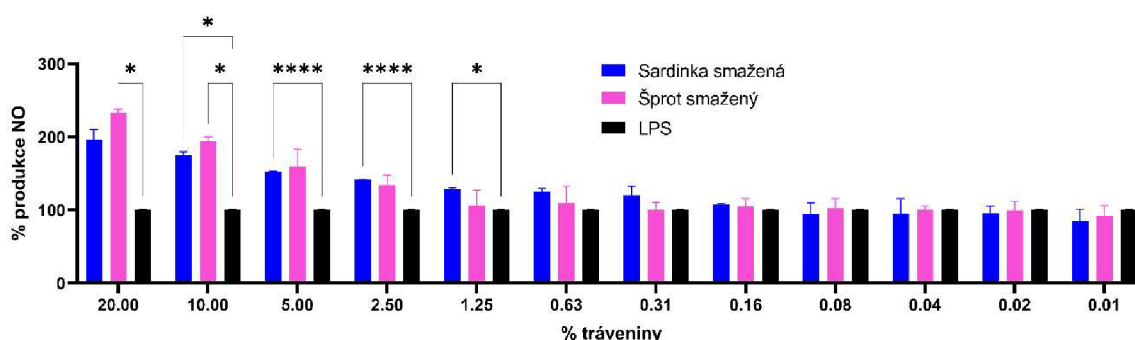
4.2.8 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly vyjádřeny průměrem se směrodatnou odchylkou. Pro statistické vyhodnocení byl použit program GraphPad Prism a nepárový t-test. Statistická významnost byla posouzena na hladině významnosti $p < 0,5$.

5 Výsledky

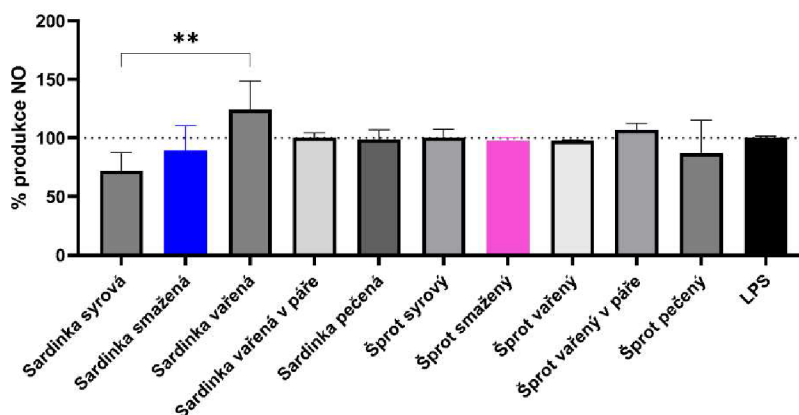
5.1 Produkce NO a toxicita

Námi testované vzorky byly s výjimkou smažených sardinek a šprotů toxické do koncentrace 0,04 % tráveniny v testovaném vzorku. Pouze smažené vzorky nevykazovaly cytotoxickou aktivitu ani při nejvyšší koncentraci tráveniny, nicméně vykazovaly zvýšenou produkci NO s rostoucím procentem tráveniny ve vzorku (obr. 6). Jak je vidět na grafu pro koncentraci 20; 10; 6; 2,5 a 1,25 % tráveniny v testovaném vzorku je statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami stimulovanými pomocí LPS. S klesající koncentrací tráveniny klesá i procento produkce NO, kdy v koncentraci 20 % dochází u sardinek k růstu produkce NO o 100 % v porovnání s kontrolou a u šprotů je tento růst dokonce ještě vyšší, a to na hladině významnosti $p = 0,5$. Při koncentraci 1,25 % tráveniny ve vzorku je růst produkce NO více jak 20 %.



Obrázek 6: Graf zobrazující jednotlivé koncentrace tráveniny ve vzorcích 2 a 7 a statisticky významný rozdíl v produkci NO mezi vzorkem a kontrolou u některých koncentrací.

Ostatní vzorky vykazovaly toxicitu až do koncentrace 0,04 % tráveniny ve vzorku, z tohoto důvodu byla pro všechny vzorky zvolena stejná koncentrace pro možnost vyhodnocení. Z výsledků je patrné, že u většiny vzorků byla produkce NO stejná jako u buněk ošetřených výhradně pouze LPS. Pouze u syrové sardinky a smažené sardinky byla produkce NO nižší. Nicméně tyto výsledky nejsou statisticky významné. Statisticky významný rozdíl byl pouze u syrové a vařené sardinky, kde byla produkce NO téměř dvojnásobná (obr. 7).



Obrázek 7: Graf zobrazující produkci NO všech vzorků, ** statistická významnost na hladině 0,01

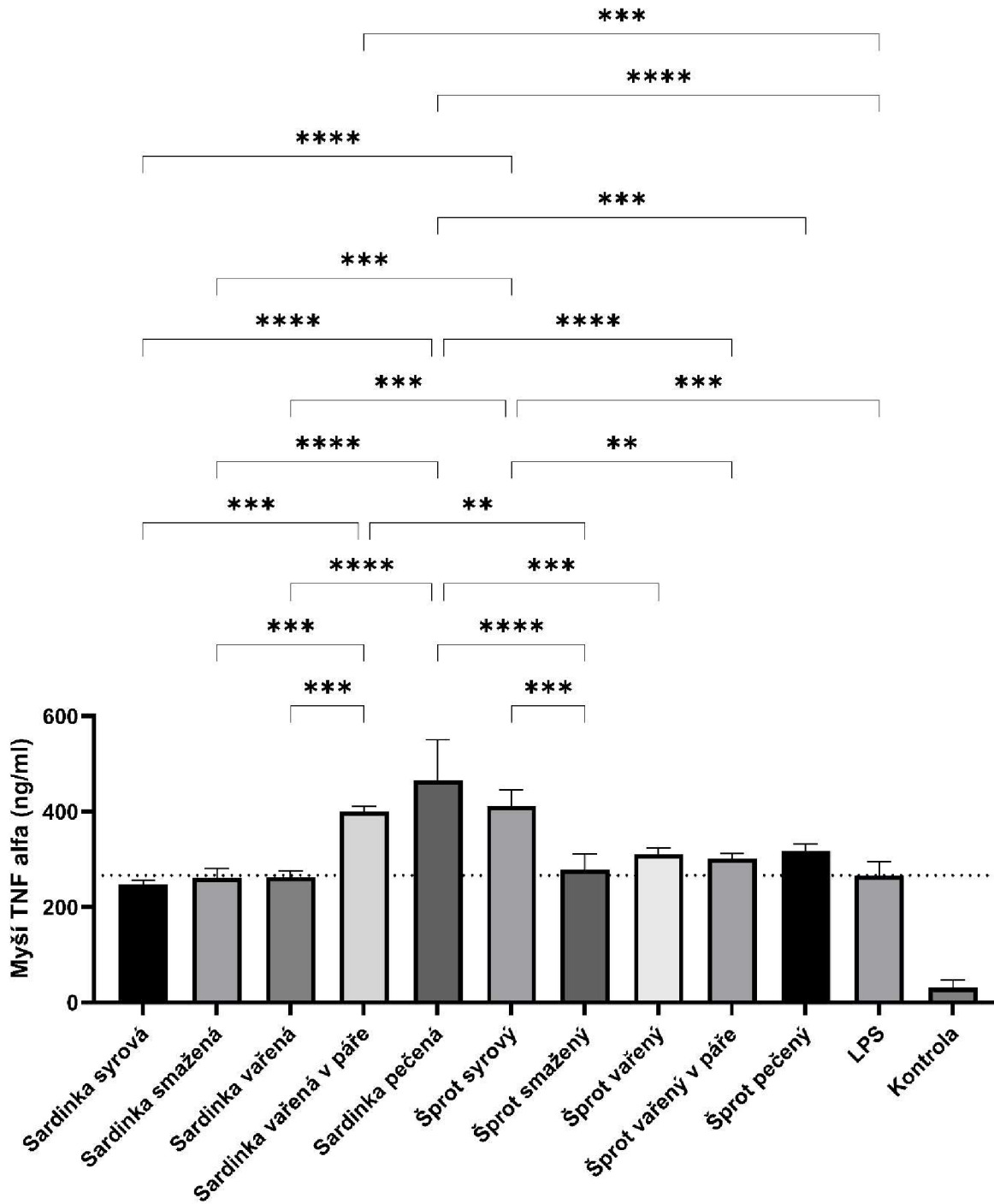
5.2 Produkce TNF- α

Ke stanovení produkce TNF- α byly použity buněčné linie RAW264.7. Produkce TNF- α ve vzorcích s obsahem tráveniny 0,04 % vedla ke zvýšení produkce TNF- α (tab. 6). U sardinek vařených v páře, pečených a syrových šprotů byla zaznamenána téměř dvojnásobná produkce TNF- α ve srovnání s buňkami ošetřenými LPS. U syrových sardinek byl zaznamenán 8 % pokles produkce TNF- α , stejně tak u smažených a vařených, kdy došlo k 2% respektive 1% poklesu produkce (obr. 8).

Tabulka 5: Přehled produkce TNF- α se směrodatnými odchylkami

Vzorek	TNF- α (ng/ml) (průměr \pm SD)
Sardinka syrová	246,8 \pm 9,6
Sardinka smažená	260,8 \pm 20,0
Sardinka vařená	263,3 \pm 12,7
Sardinka vařená v páře	400,4 \pm 11,0***
Sardinka pečená	465,9 \pm 84,9****
Šprot syrový	411,9 \pm 33,4***
Šprot smažený	277,6 \pm 34,0
Šprot vařený	311,5 \pm 12,0
Šprot vařený v páře	302,3 \pm 10,3
Šprot pečený	317,7 \pm 14,8
LPS	266,3 \pm 29,6
kontrola	31,4 \pm 14,6

Produkce myší TNF- α na buněčné líní RAW264.7 s přídatkem 0,04 % tráveniny sardinek a šprotů, stimulovaných pomocí LPS. hvězdičky ukazují významnost středních hodnot pro tři vzájemná měření ve srovnání s buňkami ošetřenými pouze s LPS *** ($p < 0,001$) a **** ($p < 0,0001$)



Obrázek 8: Přehled koncentrace produkce myší TNF- α ve vzorcích 0,04 % tráveniny ošetřených pomocí LPS po 24 h inkubaci

6 Diskuze

Sardinky a šprotky jsou druhy pelargonických ryb významných především kvůli jejich využití ve výživě lidí i použití zbytků ze zpracování k výrobě součástí krmiv. Obsah tuku v těchto druzích ryb se pohybuje kolem 10 %, což je u ryb průměrná hodnota. Rybí tuk je nutričně hodnotný díky dobrému zastoupení omega-3 PUFA, kterých ve stravě obvykle bývá nedostatek. EPA a DHA spolu s jejich prekurzorem ALA jsou esenciální MK, a tak je jejich doplnění prostřednictvím stravy nezbytně nutné. Pokud nedochází k dostatečnému doplnění omega-3 stravou, je doporučována suplementace. Je ovšem důležité zabezpečit, aby nedocházelo k oxidaci suplementů. Oxidace a tepelná stabilita tuků ovlivňuje protizánětlivé a antioxidační účinky daného tuku po přípravě pokrmů. Ve studii Flakemore et al. (2017) znižují odolnost mastných kyselin v jehněčím masu až do 70 °C. U ryb dochází k úbytku PUFA při 100 °C o 20 %, při 160 °C v závislosti na čase až o 70 % (Candela et al. 1998). Dle Larsen and Quek (2010) nejsou rozdíly ve způsobu úpravy promítnuty do úbytku PUFA.

Před tepelnou úpravou jsou často ryby mrazeny, přičemž také dochází ke změnám tuků. Obecně dochází k vzrůstu peroxidového čísla a zvýšení volných mastných kyselin, nicméně nárůsty těchto hodnot nejsou nijak dramatické (Aubourg 1999). Dle de Castro et al. (2007) mrazení ovšem nemá prokazatelný vliv na ryby zamražené s kůží, ale má vliv na ryby zamražené bez kůže. Absence kůže zřejmě způsobuje úbytek PUFA a nárůst SFA. Při tepelné úpravě naopak kůže FA chrání, jelikož autoři studie došli k závěru, že při smažení ryby bez kůže dochází k vyššímu poklesu PUFA než při smažení s kůží. Pokles byl dokonce vyšší než při přípravě v páře. Toto zjištění mění výše zmíněný názor Larsen and Quek (2010), že způsob přípravy neovlivňuje pokles PUFA, jelikož nezahrnuje přítomnost či nepřítomnost kůže.

Omega-3 PUFA mají vliv na mnoho aspektů týkajících se lidského zdraví. Mají vliv na složení a tím i fungování buněčných membrán, což vede k ovlivnění vzniku obezity. Mnoho studií hovoří při suplementaci omega-3 o úbytku tělesné hmotnosti (Sato et al. 2010; Hensler et al. 2011), nebo tukových zásob, ale zároveň je i mnoho takových, kde k žádnému úbytku tělesné hmotnosti nebo tuku nedochází (Todoric et al. 2006; Figueras et al. 2011; Flachs et al. 2011). Důvodem mohou být rozdíly mezi genetickými předpoklady nebo míra pohybu. Inhibicí osteoklastů napomáhají omega-3 proti vzniku osteoporózy a podporují tím zdraví kostí (Sun et al. 2003a). Přesný mechanismus není znám, nicméně pravděpodobně je tento jev způsoben zvýšením ukládání vápníku (Vanpapendorp et al. 1995). Dále mohou omega-3 zvyšovat odezvu na konvenční léčbu během nádorových onemocnění a podpořit tak uzdravení. Přesný mechanismus působení omega-3 není ani zde plně znám, nicméně hlavním principem řešení zánětlivých problémů v těle je inhibice prozánětlivých markerů jako jsou IL, TNF nebo NO. Díky schopnosti inhibice prokoagulační aktivity mohou omega-3 přinášet i kardioprotekční schopnosti (Innes & Calder 2020).

Lidský mozek je z větší části tvořen lipidy a z velké konkrétně PUFA, které se podílí na struktuře membrán a vývoje a funkci mozku (Delgado-Noguera et al. 2015).

Lipopolysacharid přidáný k testované trávenině sardinek a šprotů může inhibovat produkci markerů interleukinů buňkami RAW264.7, na které působí. Díky této reakci lze hovořit o protizánětlivé aktivitě daného vzorku, kterou lze u rybiho oleje očekávat díky zastoupení významného množství zdraví prospěšných mastných kyselin.

Vzorok tuku sardinek a šprotů byly podrobeny rozdílné kulinářské úpravě k lepšímu znázornění důležitosti vhodné úpravy potravin a vlivu úpravy na zdraví. Jednalo se o smažení, vaření, pečení a vaření v páře a k tomu jeden neupravený vzorek. Doba a teploty přípravy nejsou známy, což může mít vliv na vyhodnocení, podobně jako znižuje (Candela et al. 1998).

Dalším z faktorů, který může výsledky zkreslovat a ovlivňovat je fakt, že není zcela jasné, jaké množství mastných kyselin prošlo přes trávicí model do výsledného vzorku.

I přes opakování pokusů byly nakonec úspěšné jen pokusy testující produkci NO a TNF- α . První sada výsledků se zabývá produkcí NO a toxicitou. Místo inhibice prozánětlivých markerů docházelo k jejich produkci. Tento výsledek vykázaný buňkami RAW264.7. Toxicita byla u vzorků projevena až do koncentrace tráveniny 0,04 %. Jediné vzorky, které nevykazovaly cytotoxicitu ani při nejvyšší koncentraci byly smažené vzorky. Vykazovaly ovšem zvýšenou produkci NO, která se s množstvím tráveniny zvyšovala. Statistický význam byl u koncentrace 1,25 % a více. Nejnižší produkce NO byla pozorována u syrové sardinky a nejvyšší u vařené. Zde se naskytuje otázka, zda je možné, že u smažených vzorků byly PUFA ochráněny při smažení kůží, podobně jako tomu bylo u (de Castro et al. 2007). Tato informace bohužel není dostupná.

Druhá sada výsledků se zabývá produkcí TNF- α a byly opět použity buněčné linie RAW264.7. I u těchto vzorků došlo k produkci zánětlivého markeru místo jeho inhibice. Nejvyšší produkce TNF- α byla pozorována u vzorku pečené sardinky v obsahu tráveniny ve vzorku 0,04 %, kde obsah vyprodukovaného TNF- α činil $465,9 \pm 84,9$ ng/ml. Nejnižší obsah naopak sardinka syrová s hodnotou $246,8 \pm 9,6$ ng/ml. Sardinky vařené v páře a pečené a syrové šproty produkovaly téměř dvojnásobné množství TNF- α ve srovnání s buňkami ošetřenými LPS. U syrových sardinek byl zaznamenán naopak 8% pokles produkce TNF- α vůči LPS. Nízký pokles byl také u smažených a vařených sardinek. I zde by bylo ideální znát detaily úpravy vzorků pro přesnější závěr, nicméně pokud bychom vycházeli z výzkumu (Larsen & Quek 2010), pak není třeba brát úpravu v úvahu. Na druhou stranu u těchto vzorků mnoho vzájemných statisticky významných rozdílů. Z toho by se dalo vyvodit, že v produkci TNF- α hraje kulinářská úprava vyšší roli, než například při produkci NO.

7 Závěr

Hypotéza hovoří o schopnosti omega-3 mastných kyselin potlačovat zánětlivé markery, nicméně na základě výsledků z provedených pokusů nebyla tato hypotéza prokázána. Vzorky vykazovaly naopak zánětlivou aktivitu. Jedním z důvodů tohoto výsledku může být nešetrná úprava tuku, nicméně ani u nezpracovaných vzorků nebyla protizánětlivá aktivita prokázána. Lze říci, že tepelná úprava ryb má negativní efekt na protizánětlivou aktivitu omega-3 a dle získaných výsledků není potvrzen pozitivní efekt na protizánětlivou aktivitu ani u nezpracovaných vzorků.

8 Literatura

- Abu Mweis S, Jew S, Tayyem R, Agraib L. 2018. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid containing supplements modulate risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis of randomised placebo-control human clinical trials. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **31**:67-84.
- Adili R, Hawley M, Holinstat M. 2018. Regulation of platelet function and thrombosis by omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **139**:10-18.
- Akesson B, Gronowitz S, Herslof B. 1976. STEREOSPECIFICITY OF HEPATIC LIPASES. *Febs Letters* **71**:241-244.
- Al-Khalaifah H. 2020. Modulatory Effect of Dietary Polyunsaturated Fatty Acids on Immunity, Represented by Phagocytic Activity. *Frontiers in Veterinary Science* **7**.
- Al-Saghir S, Thurner K, Wagner K-H, Frisch G, Luf W, Razzazi-Fazeli E, Elmadfa I. 2004. Effects of different cooking procedures on lipid quality and cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:5290-5296.
- Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang S, Rahman SM, Robert-McComb J, Moustaid-Moussa N. 2018. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *Journal of Nutritional Biochemistry* **58**:1-16.
- Alvarenga BR, Xavier FAN, Soares FLF, Carneiro RL. 2018. Thermal Stability Assessment of Vegetable Oils by Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Food Analytical Methods* **11**:1969-1976.
- Alzaa, Guillaume, Ravetti. 2018. Evaluation of Chemical and Physical Changes in Different Commercial Oils during Heating.
- Armand M. 2007. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10**:156-164.
- Armand M, Pasquier B, Andre M, Borel P, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Portugal H, Jaussan V, Lairon D. 1999. Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**:1096-1106.
- Arnoldussen IAC, Kiliaan AJ. 2014. Impact of DHA on Metabolic Diseases from Womb to Tomb. *Marine Drugs* **12**:6190-6212.
- Aubourg SP. 1999. Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species. *Food Research International* **32**:497-502.
- Berger ME, et al. 2017. Omega-6 to omega-3 polyunsaturated fatty acid ratio and subsequent mood disorders in young people with at-risk mental states: a 7-year longitudinal study. *Translational Psychiatry* **7**.
- Calder PC. 2012. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Molecular Nutrition & Food Research* **56**:1073-1080.
- Calder PC. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *British Journal of Clinical Pharmacology* **75**:645-662.
- Calder PC. 2015. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **39**:18S-32S.
- Campos-Perez W, Martinez-Lopez E. 2021. Effects of short chain fatty acids on metabolic and inflammatory processes in human health. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1866**.
- Candela M, Astiasaran I, Bello J. 1998. Deep-fat frying modifies high-fat fish lipid fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:2793-2796.

- Carpi P, Morello EB, Uriarte A, Panfili M, Roel B, Santojanni A, Donato F, Arneri E. 2017. Impact of the fishery for late-larval European sardine (*Sardina pilchardus*) on the adult stock in the Adriatic Sea. *Ices Journal of Marine Science* **74**:728-740.
- Chen YM, Ho SC, Lam SS. 2010. Higher sea fish intake is associated with greater bone mass and lower osteoporosis risk in postmenopausal Chinese women. *Osteoporosis International* **21**:939-946.
- Cortesi PA, et al. 2021. Trends in cardiovascular diseases burden and vascular risk factors in Italy: The Global Burden of Disease study 1990-2017. *European Journal of Preventive Cardiology* **28**:385-396.
- Cummings JH, Stephen AM. 2007. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition* **61**:S5-S18.
- Czepiel J, Biesiada G, Brzozowski T, Ptak-Belowska A, Perucki W, Birczynska M, Jurczyszyn A, Strzalka M, Targosz A, Garlicki A. 2014. THE ROLE OF LOCAL AND SYSTEMIC CYTOKINES IN PATIENTS INFECTED WITH CLOSTRIDIUM DIFFICILE. *Journal of Physiology and Pharmacology* **65**:695-703.
- D'Eliseo D, Velotti F. 2016. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *Journal of Clinical Medicine* **5**.
- Dashty M. 2013. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry* **46**:1339-1352.
- de Castro FAF, Sant'Ana HMP, Campos FM, Costa NMB, Silva MTC, Salaro AL, Franceschini SdCC. 2007. Fatty acid composition of three freshwater fishes under different storage and cooking processes. *Food chemistry* **103**:1080-1090.
- Dolan E, Sale C. 2019. Protein and bone health across the lifespan. *Proceedings of the Nutrition Society* **78**:45-55.
- Eggersdorfer M, Wyss A. 2018. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **652**:18-26.
- Endo J, Arita M. 2016. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Cardiology* **67**:22-27.
- Fairchild TJ, Armstrong AA, Rao A, Liu H, Lawrence S, Fournier PA. 2003. Glycogen synthesis in muscle fibers during active recovery from intense exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **35**:595-602.
- FAO. 2010. Fats and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper 91. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fave G, Coste TC, Armand M. 2004. Physicochemical properties of lipids: New strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cellular and Molecular Biology* **50**:815-831.
- Figueras M, Olivan M, Busquets S, López-Soriano FJ, Argilés JM. 2011. Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status. *Obesity* **19**:362-369.
- Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogdon JG, Pan LP, Sherry B, Dietz W. 2012. Obesity and Severe Obesity Forecasts Through 2030. *American Journal of Preventive Medicine* **42**:563-570.
- Flachs P, Rühl R, Hensler M, Janovska P, Zouhar P, Kus V, Macek Jilkova Z, Papp E, Kuda O, Svobodova M. 2011. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. *Diabetologia* **54**:2626-2638.
- Flakemore AR, Malau-Aduli BS, Nichols PD, Malau-Aduli AEO. 2017. Omega-3 fatty acids, nutrient retention values, and sensory meat eating quality in cooked and raw Australian lamb. *Meat science* **123**:79-87.

- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults - Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama-Journal of the American Medical Association* **287**:356-359.
- Friedman AN, Yu ZS, Tabbey R, Denski C, Tamez H, Wenger J, Thadhani R, Li Y, Watkins BA. 2013. Inverse relationship between long-chain n-3 fatty acids and risk of sudden cardiac death in patients starting hemodialysis. *Kidney International* **83**:1130-1135.
- Fullana A, Carbonell-Barrachina AA, Sidhu S. 2004. Comparison of volatile aldehydes present in the cooking fumes of extra virgin olive, olive, and canola oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:5207-5214.
- Furman D, et al. 2019. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine* **25**:1822-1832.
- Ganesan B, Brothersen C, McMahan DJ. 2014. Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical reviews in food science and nutrition* **54**:98-114.
- Gao LG, Cao J, Mao QX, Lu XC, Zhou XL, Fan L. 2013. Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acid-supplementation on platelet aggregation in humans: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* **226**:328-334.
- Haast RAM, Kiliaan AJ. 2015. Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **92**:3-14.
- Hauri HP, Sander B, Naim H. 1994. INDUCTION OF LACTASE BIOSYNTHESIS IN THE HUMAN INTESTINAL EPITHELIAL-CELL LINE CACO-2. *European Journal of Biochemistry* **219**:539-546.
- Hensler M, Bardova K, Jilkova ZM, Wahli W, Meztger D, Chambon P, Kopecky J, Flachs P. 2011. The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice. *Lipids in health and disease* **10**:1-7.
- Hilgendorf I, Swirski FK, Robbins CS. 2015. Monocyte Fate in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **35**:272-279.
- Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, Tesouro M. 2014. OBESITY, INFLAMMATION AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **28**:169-176.
- Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. 2018. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology* **100**:1-19.
- Innes JK, Calder PC. 2018. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **132**:41-48.
- Innes JK, Calder PC. 2020. Marine Omega-3 (N-3) Fatty Acids for Cardiovascular Health: An Update for 2020. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Ivanovs K, Blumberga D. 2017. Extraction of fish oil using green extraction methods: a short review. *International Scientific Conference - Environmental and Climate Technologies (Conect 2017)* **128**:477-483.
- Jakobsen MU, Overvad K. 2011. Macronutrient advice for ischemic heart disease prevention. *Current Opinion in Lipidology* **22**:33-36.
- Jeromson S, Gallagher IJ, Galloway SDR, Hamilton DL. 2015. Omega-3 Fatty Acids and Skeletal Muscle Health. *Marine Drugs* **13**:6977-7004.
- Katragadda HR, Fullana A, Sidhu S, Carbonell-Barrachina AA. 2010. Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. *Food Chemistry* **120**:59-65.
- Kendall CWC, Esfahani A, Jenkins DJA. 2010. The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids* **24**:42-48.
- Kono N, Arai H. 2015. Intracellular Transport of Fat-Soluble Vitamins A and E. *Traffic* **16**:19-34.

- Kumar NG, Contaifer D, Madurantakam P, Carbone S, Price ET, Van Tassell B, Brophy DF, Wijesinghe DS. 2019. Dietary Bioactive Fatty Acids as Modulators of Immune Function: Implications on Human Health. *Nutrients* **11**.
- Larsen D, Quek SY. 2010. Laurence Eyres. Effect of cooking method on the fatty acid profile of New Zealand King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), *Food Chemistry* **119**:785-790.
- Lingvay I, Sumithran P, Cohen RV, Le Roux CW. 2022. Obesity management as a primary treatment goal for type 2 diabetes: time to reframe the conversation. *Lancet* **399**:394-405.
- Lo CJ, Chiu KC, Fu MJ, Lo R, Helton S. 1999. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *Journal of Surgical Research* **82**:216-221.
- Loveday SM. 2019. Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 10 **10**:311-339.
- Ma XY, Liu JP, Song ZY. 2012. Glycemic load, glycemic index and risk of cardiovascular diseases: Meta-analyses of prospective studies. *Atherosclerosis* **223**:491-496.
- Mac Donal O, Chediack JG, Caviedes-Vidal E. 2008. Isolation of epithelial cells, villi and crypts from small intestine of pigeons (*Columba livia*). *Biocell* **32**:219-227.
- Manson JE, Bassuk SS, Cook NR, Lee IM, Mora S, Albert CM, Buring JE, Grp VR. 2020. Vitamin D, Marine n-3 Fatty Acids, and Primary Prevention of Cardiovascular Disease Current Evidence. *Circulation Research* **126**:112-128.
- Marinangeli CPF, House JD. 2017. Potential impact of the digestible indispensable amino acid score as a measure of protein quality on dietary regulations and health. *Nutrition Reviews* **75**:658-667.
- Martinez-Fernandez L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. 2015. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **121**:24-41.
- Mestas J, Ley K. 2008. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* **18**:228-232.
- Meyer BJ. 2011. Are we consuming enough long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids for optimal health? *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **85**:275-280.
- Michalski MC, et al. 2013. Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* **52**:354-373.
- Miller PE, Van Elswyk M, Alexander DD. 2014. Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid and Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *American Journal of Hypertension* **27**:885-896.
- Mishra S, S.C.Manchanda. 2012. Cooking oils for heart health.
- Moeinzadeh F, Shahidi S, Mortazavi M, Dolatkah S, Kajbaf M, Javanmard SH, Moghtaderi A. 2016. Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Serum Biomarkers, Inflammatory Agents, and Quality of Life of Patients on Hemodialysis. *Iranian Journal of Kidney Diseases* **10**:381-387.
- Moon HJ, Kim TH, Byun DW, Park Y. 2012. Positive Correlation between Erythrocyte Levels of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Bone Mass in Postmenopausal Korean Women with Osteoporosis. *Annals of Nutrition and Metabolism* **60**:146-153.
- Osadnik K, Jaworska J. 2016. ANALYSIS OF omega-3 FATTY ACID CONTENT OF POLISH FISH OIL DRUG AND DIETARY SUPPLEMENTS. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **73**:875-883.

- Paes AMD, Gaspar RS, Fuentes E, Wehinger S, Palomo I, Trostchansky A. 2019. Lipid Metabolism and Signaling in Platelet Function. *Bioactive Lipids in Health and Disease* **1127**:97-115.
- Pilon G, Ruzzin J, Rioux LE, Lavigne C, White PJ, Froyland L, Jacques H, Bryl P, Beaulieu L, Marette A. 2011. Differential effects of various fish proteins in altering body weight, adiposity, inflammatory status, and insulin sensitivity in high-fat-fed rats. *Metabolism-Clinical and Experimental* **60**:1122-1130.
- Piper K, Garelnabi M. 2020. Eicosanoids: Atherosclerosis and cardiometabolic health. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology* **19**.
- Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN. 2007. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**:231-248.
- Rastogi T, Reddy KS, Vaz M, Spiegelman D, Prabhakaran D, Willett WC, Stampfer MJ, Ascherio A. 2004. Diet and risk of ischemic heart disease in India. *American Journal of Clinical Nutrition* **79**:582-592.
- Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KWJ, Calder PC. 2006. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**:331-342.
- Reynolds A, Mann J, Cummings JH, Winter N, Mete E, Te Morenga L. 2019. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet* **393**:434-445.
- Rubanyi GM. 1993. THE ROLE OF ENDOTHELIUM IN CARDIOVASCULAR HOMEOSTASIS AND DISEASES. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **22**:S1-S14.
- Ruprich J. 2019. Správný poměr tuků (omega 6/omega3) v dietě omezuje záněty v těle - "podobně jako aspirin nebo ibuprofen". SZÚ, Czech republic, Brno.
- Sa AGA, Moreno YMF, Carciofi BAM. 2020. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology* **97**:170-184.
- Saini RK, Keum YS. 2018. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. *Life Sciences* **203**:255-267.
- Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, Mizuguchi K, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y. 2010. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* **59**:2495-2504.
- Seidemann SB, Claggett B, Cheng S, Henglin M, Shah A, Steffen LM, Folsom AR, Rimm EB, Willett WC, Solomon SD. 2018. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *Lancet Public Health* **3**:E419-E428.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. 2018. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 9 **9**:345-381.
- Sharma T, Mandal CC. 2020. Omega-3 fatty acids in pathological calcification and bone health. *Journal of Food Biochemistry* **44**.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. 2022. Cancer statistics, 2022. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* **72**:7-33.
- Silva JR, Burger B, Kuhl CMC, Candreva T, dos Anjos MBP, Rodrigues HG. 2018. Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: From Inflammation to Repair. *Mediators of Inflammation* **2018**.
- Simopoulos AP. 2016. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* **8**.
- Sokola-Wysoczanska E, Wysoczanski T, Czyz K, Vogt A, Patkowska-Sokola B, Sokola K, Bodkowski R, Wyrostek A, Roman K. 2014. Characteristics of polyunsaturated fatty

- acids ethyl esters with high alpha-linolenic acid content as a component of biologically active health-promoting supplements. *Przemysl Chemiczny* **93**:1923-1927.
- Soldo B, Simat V, Vlahovic J, Skroza D, Ljubenkovic I, Mekinac IG. 2019. High Quality Oil Extracted from Sardine By-Products as an Alternative to Whole Sardines: Production and Refining. *European Journal of Lipid Science and Technology* **121**.
- Sorensen M. 2012. A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition* **18**:233-248.
- Stevens BR, Kaunitz JD, Wright EM. 1984. INTESTINAL TRANSPORT OF AMINO-ACIDS AND SUGARS - ADVANCES USING MEMBRANE-VESICLES. *Annual Review of Physiology* **46**:417-433.
- Sun D, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G. 2003a. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **18**:1206-1216.
- Sun DX, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G. 2003b. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **18**:1206-1216.
- Thies F, Garry JMC, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF. 2003. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* **361**:477-485.
- Timberg L, Koppel K, Kuldjärvi R, Paalme T. 2014. Ripening and Sensory Properties of Spice-Cured Sprats and Sensory Properties Development. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **23**:129-145.
- Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhäusl W, Stulnig TM. 2006. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* **49**:2109-2119.
- Vanpapendorp DH, Coetzer H, Kruger MC. 1995. BIOCHEMICAL PROFILE OF OSTEOPOROTIC PATIENTS ON ESSENTIAL FATTY-ACID SUPPLEMENTATION. *Nutrition Research* **15**:325-334.
- Vieira SA, McClements DJ, Decker EA. 2015. Challenges of Utilizing Healthy Fats in Foods. *Advances in Nutrition* **6**:309S-317S.
- Wang RX, Zhou M, Ma HL, Qiao YB, Li QS. 2021. The Role of Chronic Inflammation in Various Diseases and Anti-inflammatory Therapies Containing Natural Products. *Chemmedchem* **16**:1576-1592.
- Wang TY, Liu M, Portincasa P, Wang DQH. 2013. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *European Journal of Clinical Investigation* **43**:1203-1223.
- Wang Y-Z, Fu S-G, Wang S-Y, Yang D-J, Wu Y-HS, Chen Y-C. 2018. Effects of a natural antioxidant, polyphenol-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, on lipid stability of plant-derived omega-3 fatty-acid rich oil. *LWT* **89**:210-216.
- Watanabe Y, Tatsuno I. 2020. Prevention of Cardiovascular Events with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Mechanism Involved. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **27**:183-198.
- Wu GY. 2016. Dietary protein intake and human health. *Food & Function* **7**:1251-1265.
- Yamagata K. 2020. Prevention of Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease by n-3 Fatty Acids-Inhibiting Action on Oxidative Stress and Inflammation. *Current Pharmaceutical Design* **26**:3652-3666.
- Yaqoob P. 2009. The Nutritional Significance of Lipid Rafts. *Annual Review of Nutrition* **29**:257-282.

- Yasin YJ, Banoub JAM, Hussein A. 2019. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age- sex- specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 (vol 392, pg 1736, 2017). Lancet **393**:E44-E44.
- Yates CM, Tull SP, Madden J, Calder PC, Grimble RF, Nash GB, Rainger GE. 2011. Docosahexaenoic Acid Inhibits the Adhesion of Flowing Neutrophils to Cytokine Stimulated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Journal of Nutrition **141**:1331-1334.
- Yokoyama M, et al. 2007. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised openlabel, blinded endpoint analysis. Lancet **369**:1090-1098.

Tabulka 1: přehled DIASS v jednotlivých potravinách	12
Tabulka 2: Zastoupení MK v olejích (Mishra & S.C.Manchanda 2012).....	16
Tabulka 3: Přehled nových případů nádorových onemocnění a množství úmrtí na nádorová onemocnění (Siegel et al. 2022).	22
Tabulka 4: Shrnutí protizánětlivých a prozánětlivých markerů	27
Tabulka 5: Přehled produkce TNF- α se směrodatnými odchylkami.....	33

Obrázek 1: Dělení mastných kyselin (Innes & Calder 2018; Saini & Keum 2018)	15
Obrázek 2: zastoupení tuku a mastných kyselin v celkovém energetickém příjmu (FAO 2010)	19
Obrázek 3: Ukládání tuku v cévních stěnách vedoucí k rozvoji aterosklerózy	24
Obrázek 4: Vznik pěnitých buněk	27
Obrázek 5: Schéma trávení vzorků	30
Obrázek 6: Graf zobrazující jednotlivé koncentrace tráveniny ve vzorcích 2 a 7 a statisticky významný rozdíl v produkci NO mezi vzorkem a kontrolou u některých koncentrací	32
Obrázek 7: Graf zobrazující produkci NO všech vzorků, ** stastická významnost na hladině 0,01	32
Obrázek 8: Přehled koncentrace produkce myší TNF- α ve vzorcích 0,04 % tráveniny ošetřených pomocí LPS po 24 h inkubaci	34