



**Efekt polynenasycených mastných kyselin n-3
ve výživě potkana na expresi vybraného genu**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Nikola Zamazalová

ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci na téma *Efekt polynenasycených mastných kyselin n-3 ve výživě potkana na expresi vybraného genu* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za vstřícnost a odborný dohled při vypracování své diplomové práce. Rovněž děkuji prof. MVDr. Ing. Tomáši Komprdovi, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady a čas, který mi věnoval při zpracování výsledků v experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi, Bc. Ing. Ondrejovi Škultétymu, za pomoc v laboratoři a Ing. Barboře Němcové za poskytnutí výsledků ze stanovení mastných kyselin.

Experiment byl podpořen Interní grantovou agenturou Mendelovy univerzity v Brně, projekt číslo TP3 / 2014.

ABSTRAKT

Cílem mé diplomové práce na téma *Efekt polynenasycených mastných kyselin n-3 ve výživě potkana na expresi vybraného genu* bylo prozkoumat vliv kyseliny eikosapentaenové (EPA) a kyseliny dokosapentaenové (DHA) na expresi genů kódujících receptory GPR120, AdipoR1 a AdipoR2 ve vztahu k potlačení stavu mírného chronického zánětu organismu na modelu snížení rizika vzniku aterosklerózy dietární intervencí u laboratorního potkana. Potkanům bylo do krmné směsi MYPO přidáno 6 % oleje ze světlice barvířské (dieta S), 6 % rybího oleje (dieta F) či 6 % oleje z řasy *Schizochytrium* (dieta A). Genová exprese byla měřena metodou kvantitativní PCR v reálném čase a výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru qbase+ (Biogazelle NV). Relativní exprese genu *GPR120* byla u F diety 88 % ($P > 0,05$), u diety A 93 % ($P > 0,05$) oproti kontrolní skupině (100 %). Relativní exprese genu *ADIPOR1* byla u F diety i A diety 82 % ($P < 0,05$) oproti kontrolní skupině. U genu *ADIPOR2* to bylo 71 % ($P < 0,05$) u diety F a 68 % ($P < 0,05$) u diety A. Výsledky byly v rozporu s hypotézou, nicméně přesně se shodují s výsledky jiných studií v dostupné literatuře. Bylo by vhodné provést další studie zabývající se touto problematikou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Eikosapentaenová kyselina (EPA), Dokosahexaenová kyselina (DHA), Mírný chronický zánět, Ateroskleróza, Real-Time PCR, Genová exprese.

ABSTRACT

The aim of my thesis on topic *The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in the diet of rats on expression of selected genes* was to investigate the effect of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosapentaenoic acid (DHA) on the expression of genes which encode GPR120, AdipoR1 and AdipoR2 receptors in relation to suppress low-grade chronic inflammation in organism to reduce the risk of atherosclerosis by dietary intervention in rats. Rats were fed by a mixture MYPO with 6 % safflower oil (diet S), 6 % fish oil (diet F) or 6 % of oil from algae *Schizochytrium* (diet A). Gene expression was measured by quantitative real-time PCR method and the results were evaluated by using the software qbase + (Biogazelle NV). Relative expression of *GPR120* gene was in F diet 88 % ($P > 0,05$), in A diet 93 % ($P > 0,05$) in comparison with control group (100 %). Relative expression of *ADIPOR1* gene was in F diets and A diet 82 % ($P < 0,05$) in comparison with the control group. For *ADIPOR2* gene relative expression was 71 % ($P < 0,05$) in diet F and 68 % ($P < 0,05$) in diet A. The results were contrary to our hypothesis. However, they exactly match the results of other studies in the available literature. It would be appropriate to carry out further studies on this issue.

KEY WORDS

Eicosapentaenoic acid (EPA), Docosahexaenoic acid (DHA), Low-grade chronic inflammation, Atherosclerosis, Real-Time PCR, Gene expression.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 Lipidy.....	11
3.1.1 Struktura a klasifikace lipidů	11
3.1.2 Mastné kyseliny	12
3.1.2.1 Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA).....	14
3.1.2.1.1 PUFA n-6.....	15
3.1.2.1.2 PUFA n-3	16
3.1.2.2 Metabolismus PUFA n-3 a n-6	17
3.1.2.3 Vzájemný poměr PUFA n-3 a n-6	19
3.1.3 Vliv n-3 a n-6 PUFA na organismus	19
3.1.3.1 Kardiovaskulární onemocnění	20
3.1.3.1.1 Ateroskleróza	20
3.1.3.2 Zánět	22
3.2 Genová exprese.....	24
3.2.1 Jaderný faktor kappa B – NF- κ B	25
3.2.2 Receptor spřažený s G proteinem – GPR120	26
3.2.3 Receptory pro adiponektin – AdipoR1, AdipoR2	26
3.2.4 Receptory aktivované proliferátory peroxizomů – PPAR	28
3.2.4.1 PPAR γ	28
3.2.5 Housekeepingový gen <i>ACTB</i> – β -aktin.....	30
3.3 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR).....	31
3.4 Plynová chromatografie	33
4 MATERIÁL A METODIKA	34
4.1 Krmná část experimentu	34

4.2 Chemická část experimentu	35
4.2.1 Stanovení koncentrace glukózy v krvi – glykémie	35
4.2.2 Stanovení mastných kyselin v krmivu a ve tkáních.....	35
4.3 Molekulárně-biologická část experimentu.....	37
4.3.1 Odběr vzorků pro genovou expresi.....	37
4.3.2 Izolace RNA	37
4.3.3 Elektroforetická kontrola izolace RNA	38
4.3.4 Reverzní transkripce mRNA.....	39
4.3.5 PCR v reálném čase	40
4.4 Statistické vyhodnocení	42
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1 Příjem krmiva a hmotnost potkanů.....	43
5.2 Stanovení koncentrace glukózy v krvi - glykémie.....	46
5.3 Stanovení mastných kyselin v krmivu a ve tkáních.....	47
5.3.1 Stanovení mastných kyselin v krmivu	47
5.3.2 Stanovení EPA a DHA v tukové tkáni a v játrech.....	49
5.4 Vyhodnocení relativní exprese genů.....	51
5.4.1 Relativní exprese genu <i>GPR120</i>	52
5.4.2 Relativní exprese genů <i>ADIPOR1</i> a <i>ADIPOR2</i>	54
6 ZÁVĚR	57
7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	59
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68

1 ÚVOD

Polynenasycené mastné kyseliny a jejich vliv na organismus je v současné době velmi diskutované téma. Významné jsou jak n-6, tak i n-3 polynenasycené mastné kyseliny, jejichž účinky na organismus jsou často protichůdné. Důležitý je proto jejich vyvážený poměr ve stravě. Nejvýznamnějšími zástupci řady n-3 polynenasycených mastných kyselin jsou kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosapentaenová (DHA), které jsou součástí fosfolipidových buněčných membrán a podílejí se na řadě důležitých metabolických funkcí organismu. Mezi nejdůležitější dietárními zdroji těchto kyselin patří zejména tučné ryby, korýši a mořské řasy.

V současné době se spousta vědeckých studií zabývá protizánětlivými účinky EPA a DHA. Zvýšené riziko chronického zánětu v organismu a vzniku aterosklerózy (kardiovaskulární onemocnění) je mimo jiné podmíněno příliš vysokým poměrem polynenasycených mastných kyselin řady n-6 (kyselina linolová, se stěžejním metabolitem kyselinou arachidonovou) oproti kyselinám řady n-3. Vliv těchto kyselin na aterosklerózu a zánět je předmětem i této diplomové práce, kdy byl u skupiny laboratorních potkanů pomocí aterogenní diety podmíněn vznik aterosklerózy na modelu nízkého stupně chronického zánětu.

EPA a DHA slouží jako ligandy pro důležité membránové receptory a transkripční faktory, které modulují signální dráhy jaderného faktoru kappa B (NF- κ B), transkripčního faktoru, který má klíčovou roli v regulaci zánětlivé imunitní odpovědi.

Cílem diplomové práce bylo prozkoumat vliv těchto polynenasycených mastných kyselin na expresi genů kódujících receptor GPR120, AdipoR1 a AdipoR2. U těchto receptorů se předpokládá modulace signální dráhy NF- κ B vlivem EPA a DHA.

V teoretické části práce jsou shrnuty základní poznatky o n-3 polynenasycených mastných kyselinách, jejich metabolismus a vlivu na organismus. Dále jsou zde popsány receptory GPR120, AdipoR1 a AdipoR2 a jejich vliv na signální dráhu NF- κ B. V experimentální části je pak vyhodnocena relativní exprese genů *GPR120*, *ADIPOR1* a *ADIPOR2* u jednotlivých dietárních skupin laboratorních potkanů.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo prostudovat současnou literaturu shrnující poznatky o n-3 a n-6 polynenasycených mastných kyselinách, hlavně eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA), jako modulátorech signálních drah transkripčních faktorů PPAR γ a NF- κ B ve vztahu k potlačení stavu mírného chronického zánětu organismu na modelu snížení rizika vzniku aterosklerózy (srdečně-cévní onemocnění) dietární intervencí u laboratorního potkana.

Dále se podílet na zajištění pokusného chovu laboratorního potkana, odběru vzorků zkoumaných tkání určených k dalším analýzám a izolaci mRNA a na vlastním laboratorním měření exprese vybraných genů metodou qRT-PCR.

Získané výsledky vyhodnotit vhodnými statistickými metodami a zpracovat obvyklou formou diplomové práce.

Výstupem práce bude jednak potvrzení/vyvrácení hypotézy, že dlouhodobé podávání EPA a DHA ve srovnání s kyselinou linolovou (LA, n-6) povede v organismu ke snížení rizika navození prozánětlivého stavu a tedy ke snížení rizika aterosklerózy, a dále potvrzení/falzifikace hypotézy, že v uvedeném smyslu je DHA efektivnější než EPA.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

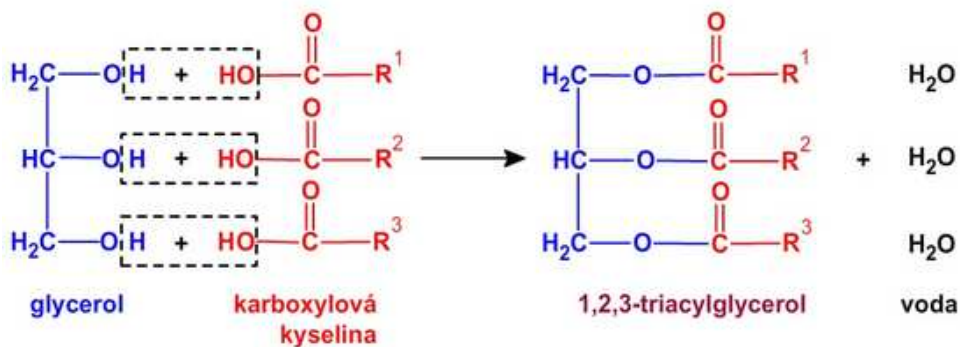
3.1 Lipidy

Lipidy jsou heterogenní skupina organických sloučenin, která má přímo či nepřímo vztah k mastným kyselinám (MK). Jejich společnou vlastností je relativní nerozpustnost ve vodě a zároveň dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech, jako je ether, chloroform, benzen (Murray *et al.*, 2002). Lipidy jsou energeticky velmi bohaté sloučeniny, slouží tedy jako zdroj a zásoba energie. Ze všech živin jsou nejbohatším zdrojem energie. Jejich energetická denzita činí 9,3 kcal (39 kJ) na 1 gram tuku, což je více než dvojnásobek oproti sacharidům a bílkovinám (4 kcal = 17 kJ; Matouš, 2010). Dále jsou základní stavební složkou buněčných membrán ve formě fosfolipidů. Důležitou roli hrají i v termoregulaci, kde podkožní tuk tepelně izoluje organismus proti teplotním výkyvům. Rovněž chrání vnitřní orgány proti mechanickému poškození. Nepolární lipidy se nachází v nervové tkáni, kde se podílí na šíření depolarizačních vln podél myelinových nervových vláken (Novák, 2002).

Lipidy jsou důležitou složkou potravy nejen pro svou vysokou energetickou hodnotu, ale i pro obsah esenciálních mastných kyselin a v tucích rozpustných vitamínů (A, D, E, K) obsažených v lipidové složce přirozené potravy (Murray *et al.*, 2002).

3.1.1 Struktura a klasifikace lipidů

Lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a jednosytného nebo trojsytného alkoholu, které vznikají esterifikací (viz obr. 1). Nejjednodušší lipidy jsou acylglyceroly, tedy estery vyšších mastných kyselin a glycerolu (1,2,3-propantriol). Triacylglyceroly jsou nejvýznamnější rezervní formou volných MK (Holeček, 2006).



Obr. 1: Esterifikace – reakce glycerolu s mastnými kyselinami za vzniku triacylglycerolu. Převzato z: Matouš, 2010.

V současnosti nejvíce využívaný typ klasifikace lipidů je od Bloora, jež byla postupem času modifikována do podoby, která je zpracována v Harperově biochemii (Murray *et al.*, 2002).

1. **Jednoduché lipidy (tzv. homolipidy)** – estery mastných kyselin s různými alkoholy. Podle struktury vázaného alkoholu se dále dělí na:
 - Tuky – estery MK a glycerolu. V kapalném skupenství se nazývají oleje.
 - Vosky – estery MK s vyššími jednosytnými alkoholy.
2. **Složené lipidy (tzv. heterolipidy)** – estery obsahující mimo MK a alkohol ještě další kovalentně vázané skupiny.
 - Fosfolipidy – obsahují mimo MK a alkohol i zbytek kyseliny fosforečné. Dále se dělí na glycerolfosfolipidy (alkohol = glycerol) a sfingofosfolipidy (alkohol = sfingosin).
 - Glykolipidy – lipidy obsahující MK, sfingenin a sacharidovou složku.
 - Ostatní složené lipidy – sulfolipidy, aminolipidy, lipoproteiny
3. **Prekurzory a odvozené lipidy** – mastné kyseliny, glycerol, steroidy, alkoholy včetně glycerolu a sterolů, mastné aldehydy a ketolátky, v tucích rozpustné vitaminy a hormony.

3.1.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou monokarboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem, jejichž obecný vzorec je R-COOH. Mastné kyseliny jsou nejdůležitější složkou lipidů, nacházejí se v přírodních tucích a olejích ve formě esterů. Mohou se však vyskytovat i jako tzv. volné MK (neesterifikované), které jsou přítomny v krevní plazmě (Velíšek, 1999). Zpravidla je v jejich řetězci sudý počet uhlíkových atomů, jelikož jsou syntetizovány spojením C₂ jednotek acetylkoenzymu-A (Novák, 2002).

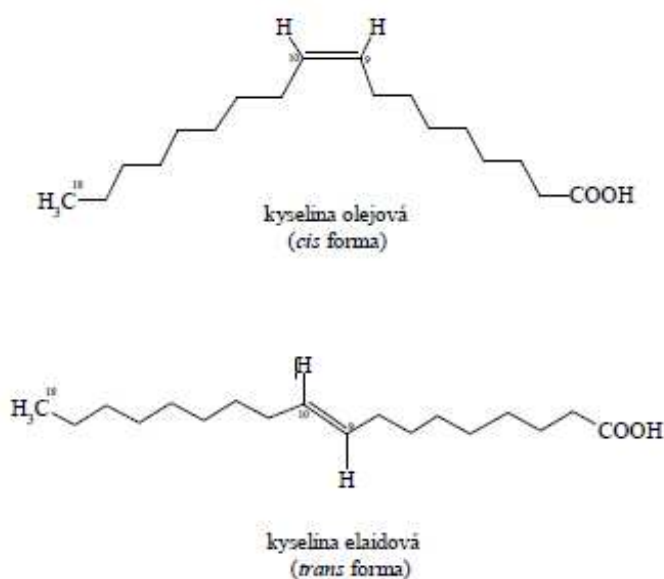
Podle délky uhlovodíkového řetězce je dělíme na MK s krátkým řetězcem (méně než 6 atomů uhlíku), MK se středně dlouhým řetězcem (6 – 12 atomů uhlíku), MK s dlouhým řetězcem (14 – 20 atomů uhlíku) a MK s velmi dlouhým řetězcem (více než 20 atomů uhlíku). Dle používanějšího typu klasifikace dělíme MK podle přítomnosti a počtu dvojných vazeb na (Murray *et al.*, 2002):

1. **Nasycené MK** – neobsahují žádnou dvojnou vazbu a tvoří dlouhé přímé řetězce. Hojně se vyskytují v živočišných tucích jako energetická rezerva.

Mezi nejrozšířenější nasycené MK se řadí kyselina palmitová (C₁₆) a stearová (C₁₈).

2. **Nenasycené MK** – ve svém řetězci obsahují minimálně jednu dvojnou vazbu. Podle jejich počtu se dále dělí na:
- Mononenasycené (MUFA; monounsaturated fatty acids) – mastné kyseliny obsahující jednu dvojnou vazbu. Jsou důležité pro správnou strukturu membrán, hlavně myelinové pochvy v nervové tkáni. Dále snižují hladinu sérového cholesterolu (Komprda, 2003). Nejvýznamnějším zástupcem MUFA je kyselina olejová (C₁₈), která se hojně vyskytuje v olivovém oleji. Dále se do této skupiny řadí například kyselina palmitoolejová (C₁₆) či eruková (C₂₂).
 - Polynenasycené (PUFA; polyunsaturated fatty acids) – ve svém řetězci obsahují dvě a více dvojných vazeb. Podrobněji jsou popsány v kapitole 3.1.2.1.

Nenasycené mastné kyseliny dělíme podle jejich geometrické izomerie na *cis* (Z-zusammen) a *trans* (E-entgegen) izomery. U *cis* konfigurace jsou obě části řetězce umístěny na stejné straně roviny dvojně vazby. V místě ohybu je úhel 120°, řetězec se ohýbá do tvaru L. Naopak u *trans* konfigurace jsou obě části řetězce umístěny na protilehlých stranách roviny dvojně vazby, řetězec je napřímený (podobné nasyceným MK) (Samková *et al.*, 2008). Geometrická izomerie je znázorněna na obr. 2.



Obr. 2: Geometrická izomerie kyseliny olejové a elaidové. Zdroj: Samková *et al.*, 2008

V názvosloví MK se užívají nejčastěji triviální názvy, dále systematické názvy odvozené od odpovídajících uhlovodíků se stejným počtem atomů uhlíku, které se počítají směrem od karboxylové skupiny. Rovněž se MK značí pomocí schematických zkratk $C_{N:M}$, kde N je počet uhlíků a M počet dvojných vazeb. Přehled vybraných mastných kyselin a jejich názvosloví je uveden v tab. 1.

Tab. 1: Názvosloví vybraných mastných kyselin. Upraveno dle: Murray et al., 2002.

Mastná kyselina	Triviální název	Schematická značka
<u>Nasycené MK</u>		
hexadekanová	palmitová	$C_{16:0}$
oktadekanová	stearová	$C_{18:0}$
<u>MUFA</u>		
oktadecenová	olejová	$C_{18:1}$
dokosenová	eruková	$C_{22:1}$
<u>PUFA n-6</u>		
oktadekadienová	linolová	$C_{18:2}$
eikosatetraenová	arachidonová	$C_{20:4}$
<u>PUFA n-3</u>		
oktadekatrienová	α -linolenová	$C_{18:3}$
eikosapentaenová (EPA)	timnodová	$C_{20:5}$
dokosaheptaenová (DHA)	cervonová	$C_{22:6}$

3.1.2.1 Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA)

Polynenasycené mastné kyseliny ve svém uhlovodíkovém řetězci obsahují dvě a více dvojných vazeb. Dále se PUFA rozlišují podle polohy první dvojné vazby od koncové methylové skupiny $-CH_3$ na n-3, n-6 a n-9 mastné kyseliny (Astarita *et al.* 2014). Místo označení n- se často užívá i ω – omega (ω -3, ω -6 a ω -9).

Většina v přírodě se vyskytujících PUFA má konfiguraci typu *cis*. Vznik *trans*-izomerie je spojen se zvýšením teploty, kdy vznikají nejčastěji jako vedlejší produkt hydrogenace nenasycených mastných kyselin v průběhu „ztužování“ rostlinných tuků při výrobě margarínu nebo při nesprávném, příliš prudkém smažení pokrmů za vysokých teplot – nad 200 °C (Svačina *et al.*, 2008). *Trans*-izomerie mastných kyselin má tedy negativní účinek na organismus. I přes stejný sumární vzorec jako *cis* mastné kyseliny mají zcela jiné vlastnosti podobající se nasyceným MK. Z hlediska

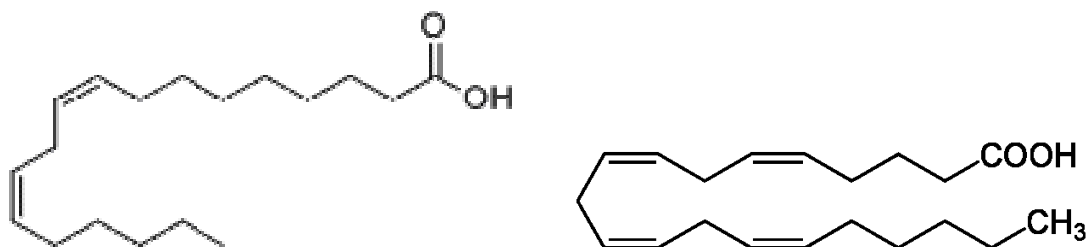
vzniku kardiovaskulárních onemocnění nese konzumace *trans*-MK výrazně vyšší riziko, než konzumace nasycených MK (Komprda, 2009).

Lidské tělo je schopné vytvořit si téměř všechny potřebné mastné kyseliny s výjimkou kyseliny linolové (LA, n-6) a kyseliny α -linolenové (ALA, n-3). Tyto kyseliny jsou pro organismus esenciální, nedokáže si je tedy sám syntetizovat. Jediným zdrojem esenciálních mastných kyselin pro lidské tělo je strava. Dostatečný příjem ALA je důležitý hlavně proto, že slouží jako prekurzor pro tvorbu řady důležitých n-3 MK, především eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) (Svačina *et al.*, 2008).

3.1.2.1.1 PUFA n-6

U n-6 mastných kyselin se první dvojná vazba nachází na 6. atomu uhlíku od methylového konce (označován jako omega - ω). Zdrojem n-6 MK jsou převážně ořechy, semena rostlin a rostlinné oleje. Nejznámější kyseliny této řady jsou kyselina linolová (LA, C_{18:2}) a kyselina arachidonová (AA, C_{20:4}), jejichž strukturní vzorce jsou zobrazeny na obr. 3. LA je prekurzorem řady n-6 kyselin, kde nejvýznamnější je právě AA, která je dále prekurzorem prozánětlivých a protrombotických lipidových mediátorů ze skupiny eikosanoidů – prostaglandinů (PG), tromboxanů (TX) a leukotrienů (LT) (Smith *et al.*, 2000)

V experimentální části práce byla u jedné skupiny (S) pokusných potkanů použita právě kyselina linolová jako zdroj n-6 mastných kyselin, která byla obsažena v oleji ze Světlice barvířské. Vzhledem k jejím vlastnostem se předpokládá, že podpoří vznik nízkého stupně chronického zánětu organismu a aterosklerózy a ještě zvýší stupeň onemocnění oproti kontrolní skupině.



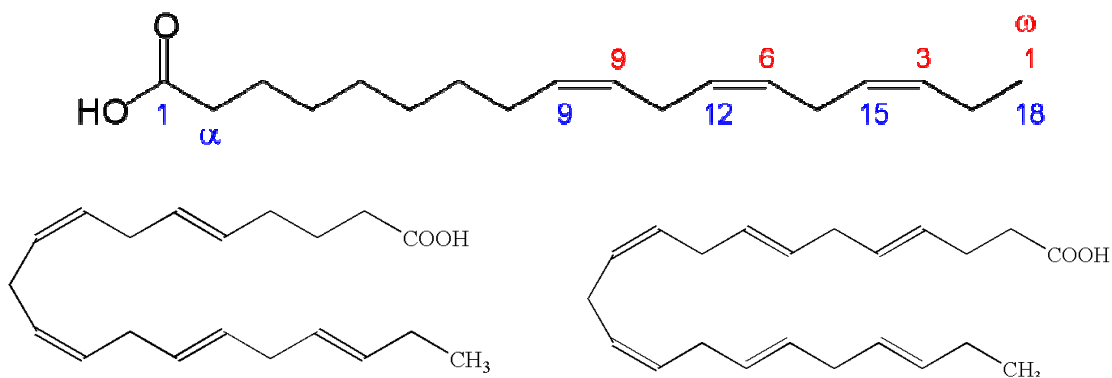
Obr. 3: Chemická struktura kyseliny linolové (vlevo) a arachidonové (vpravo). (Převzato z: Smith *et al.*, 2000)

3.1.2.1.2 PUFA n-3

U n-3 mastných kyselin se první dvojná vazba nachází na 3. atomu uhlíku od methylového konce. Hlavním přírodním zdrojem n-3 MK jsou ryby a koryši. Dále se ve větším množství nachází v tofu, mandlích, vlašských ořechách a ve lněném i řepkovém oleji (Svačina *et al.*, 2008). Z fyziologického hlediska nejdůležitějšími PUFA řady n-3 jsou EPA a DHA, které jsou v lidském organismu syntetizovány z esenciální kyseliny α -linolenové (ALA), kdy se pomocí metabolických pochodů navýší počet uhlíků a dvojných vazeb. Chemická struktura těchto kyselin je zobrazena na obr. 4.

EPA je pro organismus nepostradatelná, jelikož se podílí na správném fungování kardiovaskulárního a hormonálního systému. DHA zase zodpovídá za správnou funkci mozku, nervového systému a zraku (Wu *et al.*, 2014). Dostatečný příjem EPA a DHA je pro organismus rovněž velmi důležitý z hlediska jejich pozitivního vlivu na řadu onemocnění (viz kapitola 3.1.2). Dále jsou prekurzorem významných lipidových mediátorů (LT, TX, PG) ze skupiny protizánětlivých eikosanoidů (Martinez-Rubio *et al.*, 2013). Jejich transformace z ALA v organismu však není dostatečná, proto se doporučuje jejich příjem ve formě tučných ryb 1-2x týdně nebo v podobě suplementů v množství 250 mg EPA a DHA denně (Svačina *et al.*, 2008).

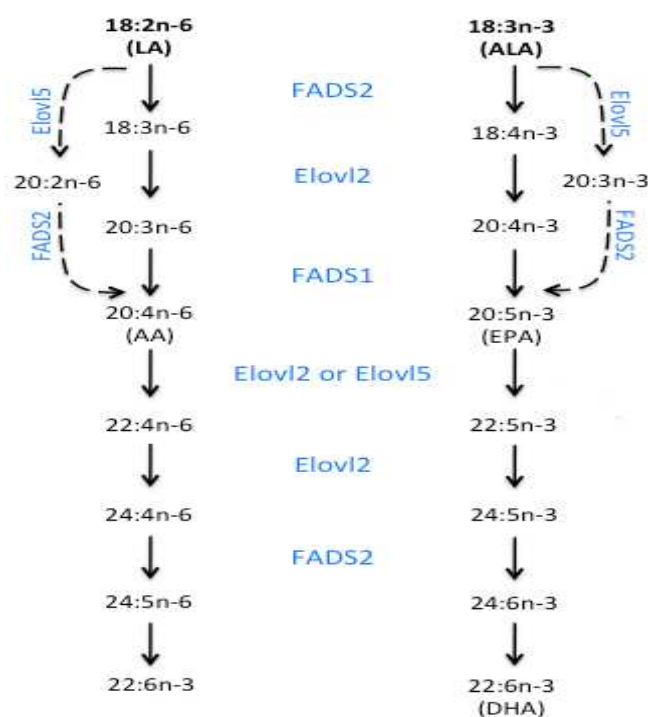
V experimentální části této práce byla u jedné skupiny (F) pokusných potkanů použita EPA jako zdroj n-3 mastných kyselin, která byla obsažena v rybím oleji. U další skupiny (A) pak byla použita DHA, která byla potkanům podávána v oleji z řasy rodu *Schizochytrium*. Předpokládá se, že EPA a DHA budou mít pozitivní vliv při léčbě zánětu a aterosklerózy, a tedy sníží stupeň těchto onemocnění.



Obr. 4: Chemická struktura kyseliny α -linolenové (nahore), EPA (vlevo) a DHA (vpravo). (Převzato z: Soumia *et al.*, 2013).

3.1.2.2 Metabolismus PUFA n-3 a n-6

LA ($C_{18:2}$, n-6) a ALA ($C_{18:3}$, n-3) jsou esenciální MK, které v organismu slouží jako prekurzor důležitých PUFA, které vznikají postupnou metabolickou přeměnou těchto kyselin. Tato metabolická dráha zahrnuje sérii reakcí za přítomnosti enzymu $\Delta 6$ a $\Delta 5$ *desaturázy*, který zajišťuje přidání dvojné vazby a enzymu *elongázy*, který ke konci řetězce přidává dva atomy uhlíku a prodlužuje tak délku uhlovodíkového řetězce MK (Nakamura a Nara, 2004), viz obr. 5. LA a ALA při syntéze PUFA soutěží o stejné enzymy - *desaturázy* a *elongázy*. Jestliže je tedy ve stravě přijímáno vysoké množství LA oproti ALA, snižuje se množství těchto enzymů využitelných pro metabolismus EPA a DHA a vznikají tak pro lidský organismus méně prospěšné lipidové mediátory – prozánětlivé eikosanoidy (Jump *et al.*, 2012).

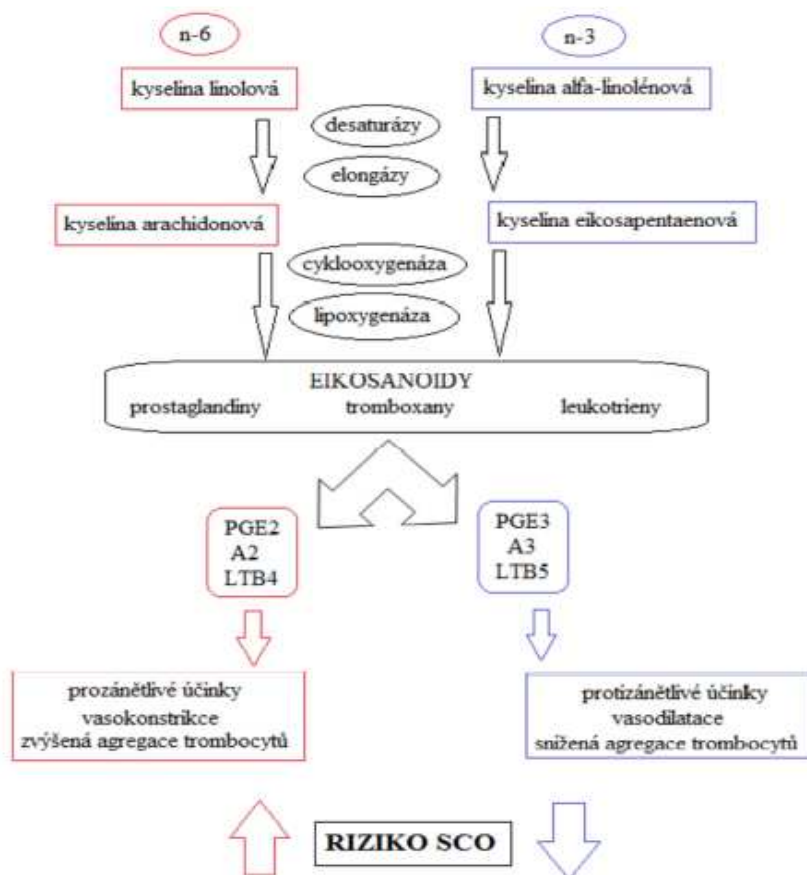


Obr. 5: Metabolismus LA a ALA. FADS1 a FADS2 značí $\Delta 6$ a $\Delta 5$ -desaturázy, Elov11 a Elov15 značí elongázy. Převzato z: Nakamura a Nara, 2004.

AA, EPA a DHA jsou složkou fosfolipidů v buněčných membránách, z nichž jsou uvolňovány působením enzymu *fosfolipasy* A_2 (Stillwell a Wassall, 2003). Po uvolnění z membrány dochází k jejich další přeměně na biologicky aktivní molekuly lipidické povahy, tzv. eikosanoidy, mezi které se řadí leukotrieny (LT), prostaglandiny (PG), tromboxany (TX) a kyselina epoxyeikosatrienová (EET; Hughes-Fulford *et al.*, 2005). Eikosanoidy jsou důležité chemické látky, které hrají klíčovou roli v imunitních

a zánětlivých reakcích v organismu. V závislosti na tom, ze které mastné kyseliny byly syntetizovány, se liší jejich klinické účinky (Flock *et al.*, 2013). Obecně platí, že eikosanoidy odvozené z EPA mají protizánětlivé a protitrombotické účinky, a tedy pozitivní vliv na lidské zdraví. Naproti tomu eikosanoidy odvozené z AA mají účinky opačné, tedy prozánětlivé a protitrombotické (Komprda, 2012). Nicméně ve skutečnosti má AA kromě negativních vlivů i schopnost inhibovat prozánětlivé cytokiny a leutotrieny a indukovat protizánětlivé lipoxiny a resolviny, čímž moduluje intenzitu a trvání zánětlivé odpovědi pomocí negativní zpětné vazby (Calder, 2009).

U AA a EPA rozlišujeme tři metabolické dráhy, kterými eikosanoidy vznikají - cyklooxygenázovou dráhu, lipoxygenázovou dráhu a epoxygenázovou dráhu (cytochrom p450). Cyklooxygenázovou (COX-2) dráhou vznikají za katalýzy enzymem *cyklooxygenáza* prostaglandiny, tromboxany a resolviny. Z AA vznikají prostaglandiny a tromboxany řady 2 (PGE₂, TXA₂) a z EPA řady 3 (PGE₃, TXA₃) a z DHA řady 1 (PGE₁). Lipoxygenázovou (5-LOX) dráhou vznikají za katalýzy enzymem *lipoxygenáza* leukotrieny a lipoxiny (Elbekai a El-Kadi, 2006), viz obr. 6. Z AA vznikají leukotrieny řady 4 (LTB₄), z EPA řady 5 (LTB₅) a z DHA řady 3 (LTB₃).



Obr. 6: Metabolismus kyseliny AA a EPA. SCO = srdečně cévní onemocnění, ateroskleróza. Převzato z: Komprda, 2007.

3.1.2.3 Vzájemný poměr PUFA n-3 a n-6

Dostatečný příjem nenasycených mastných kyselin ve výživě člověka je z hlediska zdraví velice důležitý. Doporučený denní příjem tuků pro obyvatele České republiky činí 30 %, z toho PUFA by měly být zastoupeny v rozmezí okolo 7 %, přičemž je důležité dodržovat správný poměr n-6 a n-3 MK (Komprda, 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, příjmem a kombinací esenciálních MK (LA, ALA) v organismu dochází k tvorbě biologicky aktivních látek – PG, TX a LT, jejichž účinek se liší v závislosti na druhu MK, ze které jsou syntetizovány. Eikosanoidy vzniklé z kyseliny LA (n-6) mají účinky prozánětlivé, zatímco eikosanoidy vzniklé z kyselin řady n-3 mají účinky opačné, protizánětlivé. Z tohoto důvodu je doporučený poměr n-6 a n-3 MK ideálně 1:1 až 4:1, maximálně však 5:1 (Kohout, 2010). Tento poměr MK ve stravě je ve skutečnosti několikanásobně vyšší. Simopoulos (2008) ve své práci uvádí, že v západních zemích je reálný poměr n-6:n-3 až 15-20:1. Bylo zjištěno, že v průběhu posledních 150 let se zvýšil příjem n-6 a zároveň snížil příjem n-3 MK v přímé souvislosti s nárůstem nemocí srdce. Nevyvážený poměr n-6 a n-3 MK ve stravě tedy může podporovat vznik řady závažných onemocnění, včetně kardiovaskulárních chorob, aterosklerózy, zánětlivých autoimunitních onemocnění i rakoviny.

Jiné studie uvádí, že není nutné snižování příjmu LA a AA, ale stačí zvýšení množství ALA, EPA a DHA ve stravě, jež ovlivní žádoucí zvýšení hladiny těchto MK a tedy i pozitivní vliv na zdraví (Starley, 2007).

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

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, polynenasycené mastné kyseliny řady n-3 a n-6 jsou nezbytné pro správnou funkci spousty fyziologických a biologických procesů v lidském organismu. Ovlivňují například buněčnou signalizaci, diferenciaci buněk. Hlavně DHA je důležitá již v prenatálním vývoji jedince, kde má významnou roli při vývoji nervové soustavy (Innis, 2008). Dále je složkou buněčné membrány sítnice, tedy nepostradatelná pro správnou funkci zraku (Wu *et al.*, 2014).

Dostatečný příjem EPA a DHA je pro organismus rovněž velmi důležitý z hlediska jejich pozitivního vlivu na řadu onemocnění. Důležitá je úloha n-3 MK u kardiovaskulárních onemocnění, hlavně u aterosklerózy. Ovlivňují průběh zánětlivých onemocnění a v neposlední řadě mají vliv na prevenci některých typů rakoviny.

3.1.3.1 Kardiovaskulární onemocnění

Jako kardiovaskulární onemocnění (SCO – srdečně cévní onemocnění) se označují veškeré vrozené či získané choroby srdečního svalu, cév vedoucích krev od srdce k tělním orgánům (tepny, tepénky a vlásečnice) a cév vedoucích krev zpět k srdci (žíly). Častěji se však tímto názvem označují pouze choroby srdce a tepen a v ještě užším smyslu choroby způsobené pouze kornatěním a uzavíráním (ucpáváním) tepen – aterosklerózou (Hromadová, 2004).

Nejčastější SCO je ischemická choroba srdeční, která má několik forem – akutní infarkt myokardu (úplné uzavření cévy) a angina pectoris (postupná nedokrevnost srdečního svalu). Dalšími SCO jsou mrtvice, hypertenzní onemocnění srdce, revmatická choroba srdeční, výduť aorty, kardiomyopatie, fibrilace síní, vrozená srdeční vada, endokarditida či onemocnění periferních tepen.

SCO jsou nejčastější příčinou úmrtí na celém světě, přesto až z 90 % jim lze správnou prevencí předejít. Dodržováním zdravého životního stylu (zdravá strava, dostatek pohybu a omezení kouření a alkoholu) se rizika vzniku SCO podstatně snižují.

3.1.3.1.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je multifaktoriální dlouhodobě se vyvíjející zánětlivé onemocnění cévní stěny, vedoucí ke tvorbě tzv. ateromů. Ateromy jsou tukové usazeniny kašovitě konzistence ve stěně tepen, které zužují průsvit cévy a mohou ji zcela uzavřít pro průchod krve, jejich zvrhodatění může být provázeno vznikem trombózy. Hlavní příčinou vzniku ateromů je přítomnost vysokých koncentrací nízkodenzitních lipoproteinů - LDL cholesterolu v cévách. LDL se naváže na proteoglykany cévní stěny a zahájí tak kaskádu patologických procesů směřujících k vytvoření ateromových lézí (Hromadová, 2004).

Ateroskleróza postihuje cévy kdekoliv v těle, nicméně její důsledky se nejčastěji projevují v místech, kde jde o krevní zásobení životně důležitých orgánů. K zúžení dochází především v epikardiálních arteriích myokardu, v mozkových arteriích a v arteriích dolních končetin (Češka, 2012). Onemocnění se po řadě let bezpříznakového průběhu manifestuje svými komplikacemi v podobě ischemické choroby srdeční (ICHS), ischemickou cévní mozkovou příhodou (CMP) nebo ischemickou chorobou dolních končetin (ICHDK).

Rizikové faktory pro vznik aterosklerózy se dělí na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné faktory se řadí převážně genetické predispozice, etnický původ, věk a pohlaví. Tyto faktory nelze změnit či odstranit. Ovlivnitelné faktory můžeme částečně nebo úplně potlačit správným životním stylem nebo farmakologickými medikamenty (Hromadová, 2004). Rizikové faktory způsobené nesprávným životním stylem jsou nedostatek fyzické aktivity, kouření, metabolický syndrom (obezita, diabetes mellitus, hypertenze, porucha tolerance glukózy), špatné stravovací návyky (vysoký příjem alkoholu, nadměrný energetický příjem a strava bohatá na nasycené tuky a cholesterol).

Pozitivní vliv EPA a DHA na riziko vzniku SCO se týká především tlumením chronického zánětu v organizmu, včetně cévní stěny a ovlivněním hladiny krevních lipidů – triacylglycerolů a cholesterolu (LDL i HDL frakce). Těmito kardioprotektivními účinky EPA a DHA se zabývá řada epidemiologických studií.

Dangart *et al.* (2010) ve své studii popisují vliv n-3 PUFA na kardiovaskulární funkce a snížení stupně zánětu u 25 obézních adolescentů (14 dívek a 11 chlapců) v průměrném věku $15,7 \pm 1$ rok a BMI $33,8 \pm 3,9$. Jedné skupině bylo denně podáváno 1,2 g n-3 PUFA v podobě suplementů (kapsle) po dobu 3 měsíců. Druhá skupina dostávala placebo. V pravidelných intervalech se u pacientů zkoumala struktura a funkce cév. Studie potvrdila, že denní suplementace n-3 PUFA zvyšuje koncentraci n-3 v krevním séru, zlepšuje funkci cév a snižuje stupeň zánětu ve srovnání s placebem ($p < 0,01$).

Lindquist *et al.* (2009) ve své studii zkoumali vliv sérových (plazmatických) fosfolipidů EPA a DHA na tloušťku stěny a aterosklerózy u krkavice (krční tepna) a femorální (stehenní) tepny u 487 obézních mužů s inzulinovou rezistencí a špatnými zdravotními návyky (kuřáci) o průměrném věku 61 let. Koncentrace sérových fosfolipidů EPA i DHA byla nepřímo úměrná rozsahu aterosklerózy krkavice a femorální tepny. Výsledky studie tedy potvrdily hypotézu, že EPA a DHA mají příznivý vliv na endoteliální funkce.

Marchioli *et al.* (2002) provedli rozsáhlou studii v Itálii, kdy 11 324 mužům po prodělaném infarktu myokardu podávali denně po dobu 3,5 roku 850 mg PUFA řady n-3. Po uplynutí této doby bylo zjištěno, že se u pacientů snížilo riziko úmrtí na SCO, převážně nefatální infarkt myokardu a cévní mozkové příhody až o 15-20 %. K poklesu rizika úmrtí došlo již za 4 měsíce od prvního podání n-3 MK. Výsledky studie tedy podporují teorii o kardioprotektivním účinku EPA a DHA.

3.1.3.2 Zánět

Zánět je komplexní systém biochemických a imunologických reakcí organismu a tkání na patogenní podnět či poranění s cílem odstranit počáteční příčinu poškození buněk a tkání. Dále se podílí na odstranění nevratně poškozené tkáně a následné regeneraci nebo reparaci funkce postiženého orgánu (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007). Je to nejvýznamnější obranná, ale zároveň také sebepoškozující reakce organismu, u které je často obtížné rozlišit, kdy je mobilizována k obraně a kdy už je organismus zbytečně poškozován.

Zánět v závislosti na jeho rozsahu rozdělujeme na lokální (místní) nebo systémový (celkový). Podle délky trvání pak na akutní (max. 2 týdny, bez následků) a chronický (déle než 6 týdnů, nahrazení poškozené tkáně vazivem; Ferenčík, 2005).

V souvislosti s infekcí je zánět součástí rozsáhlé imunitní reakce, kdy jsou buňky imunitního systému (hl. leukocyty, komplement) cirkulující v krevním řečišti chemotakticky lákány do místa poškození. Zánět primárně odstraňuje infekci, zahajuje opravy postižené tkáně, ale může způsobit i značné škody (Rubin *et al.*, 2011). Způsob zánětlivé odpovědi je modulován v závislosti na mnoha faktorech – povaha vyvolávající látky, délka trvání zánětu a rozsah poškození tkání.

U zánětu rozlišujeme 4 fáze (Ferenčík, 2005): iniciační (zahájení, aktivace mediátorů, chemotaxe imunitních buněk), amplifikační (zesílení zánětlivé odpovědi - více leukocytů do poškozené tkáně), destrukční (enzymatické štěpení, fagocytóza patogenů a poškozených buněk) a terminační (ukončení zánětlivé odpovědi, regenerace, reparace).

Průběh zánětu je regulován chemickými látkami – zánětlivými mediátory (např. eikosanoidy, cytokiny, kininy, histaminem). Jejich účinky spočívají v navázání se na specifický receptor cílové buňky, na kterou některé mediátory mohou působit přímo enzymaticky a/nebo toxicky. Jiné typy mediátorů zase stimulují tyto cílové buňky uvolňováním sekundárních efektorových molekul. Po aktivaci a uvolnění těchto molekul se mediátory rychle rozpadají (metabolity AA – eikosanoidy), jsou vylučovány, popřípadě jsou inhibovány buď enzymy (př. kináza) nebo komplementem (Rubin *et al.*, 2011).

Eikosanoidy (PG, TX a LT) a cytokiny jsou důležitými markery pro různá imunochemická vyšetření v klinické medicíně. Cytokiny dělíme podle jejich účinku na pro- a protizánětlivé. Mezi prozánětlivé se řadí tumor nekrotizující faktory (TNF)

a interleukiny (IL) – IL-1, IL-6, IL-8, IL-12. Mezi protizánětlivé cytokiny řadíme transformující růstové faktory (TGF) a interleukiny IL-4, IL-10, IL-13 a IL-19 (Ferenčík, 2005; Brocker *et al.*, 2010).

Bylo prokázáno, že PUFA řady n-3, především DHA, mají protizánětlivé účinky. Dlouhodobé užívání n-3 PUFA ve stravě nebo v suplementech průkazně zlepšuje imunitní systém jedince (Mourek, 2007). Řada studií se zabývá účinkem n-3 PUFA na zmírnění příznaků u chronických zánětlivých a autoimunitních onemocnění.

Ling *et al.* (2012) ve své studii popisují vliv MK na nutriční a zánětlivé markery u potkanů, u kterých byl vpravením endotoxinu indukován mírný chronický zánět. Potkanům byl do krmiva přidáván kokosový olej s přídávkem 1,3 mg AA a 3,3 mg DHA. Jako kontrolní skupina byli zdraví potkani krmeni běžkou krmnou směsí s přídávkem 2 % sojového oleje. U AA + DHA skupiny došlo po ukončení krmného pokusu k výraznému snížení kyselin LA, ALA i AA v plazmě a játrech ve srovnání s kontrolní skupinou. I hladiny TNF a IL-6 byly podstatně nižší než u kontroly. Vědci tedy došli k závěru, že PUFA snižuje stupeň zánětu a zánětlivou odpověď na endotoxin.

Drzymala-Czyz *et al.* (2012) zkoumali vliv DHA na expresi zánětu střeva u potkanů, kterým byl zánět indukován restorativní proktokolektomií s následným vyvoláním pouchitidy. Dvacet čtyři potkanů s indukovanou pouchitidou bylo rozděleno do tří skupin – kontrola (CG) bez DHA, nízká dávka DHA (LD) a vysoká dávka DHA (HD) po dobu šesti týdnů. Poté byly vyhodnoceny nutriční parametry a imunohistochemická analýza vzorků ze sliznice střeva. DHA nemá vliv na tělesnou hmotnost. Kvalita stolice i hladina protizánětlivého IL-10 byla sice výrazně vyšší u HD a LD než u CG. Nicméně byla u HD i LD vyšší i celková intenzita zánětu, DHA zde tedy neměla protizánětlivé účinky.

Figuroa *et al.* (2012) zkoumali vliv DHA na buněčné a molekulární změny u potkana laboratorního po kompresním poranění míchy. Potkanům byla napřed podávána DHA, poté došlo k poranění míchy a sledoval se ochranný vliv DHA prvních 7 dní od poranění. Došli k závěru, že DHA výrazně snížila funkční deficity v průběhu akutní fáze poranění, došlo ke zlepšení pohybových funkcí a zvýšení podílu bílé hmoty v míše. DHA měla protektivní účinky i přes nedostatečnou inhibici zánětlivých markerů pro monocyty.

3.2 Genová exprese

Genová exprese (vyjádření genu) je proces, kterým je genetická informace uložená v genu převedena v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci, tedy k tvorbě polypeptidu (proteinu). Jde o dvoustupňový proces. Nejprve je genetická informace obsažená v genové DNA přepsána do molekuly mRNA – transkripce. V druhém kroku působí mRNA jako templát pro syntézu polypeptidu – translace, překlad (Snustad a Simmons, 2009). Zkoumání genové exprese nám pomáhá pochopit základní mechanizmy řídící buňku.

Aby mohla být transkripce zahájena, jsou pro ni nezbytné transkripční faktory (TF). Jsou to regulační proteiny, které se podílejí na iniciaci transkripce tím, že se navážou na regulační oblast promotoru či zesilovače, čímž usnadňují vazbu RNA-polymerázy. Jejich prostřednictvím je genová exprese přizpůsobována potřebám buňky i celého organismu. TF se dělí na obecné, speciální a bazální. Obecné TF se vyskytují ve všech typech buněk. Speciální TF se vyskytují jen v určitém období v některých typech buněk, kde zvyšují základní úroveň transkripce. Označují se jako indukovatelné TF, které jsou na molekule DNA rozpoznány tzv. responzivními elementy (elementy odezvy). Bazální TF jsou nutné pro navození bazální transkripce v buňkách s nízkou transkripční aktivitou. Většina transkripčních faktorů musí být nejprve aktivována fosforylací, vazbou specifického ligandu nebo uvolněním navázaného inhibitoru (Alberts *et al.*, 2005).

PUFA řady n-3 a n-6 mohou modulovat expresi řady genů včetně těch, které se účastní metabolismu MK a zánětu. N-6 a n-3 MK regulují genovou expresi interakcí se specifickými transkripčními faktory, jako je PPAR (*peroxisome proliferator-activate receptor*; receptory aktivované proliferátory peroxizomů); (Sampath a Ntambi, 2006). PUFA se vážou přímo na receptory PPAR, které se pak navážou na promotor cílového genu a řídí tak jeho expresi zvýšením/snížením transkripce.

PUFA mohou rovněž regulovat expresi genů pro transkripční faktory uvnitř buněčného jádra - například jaderný faktor kappa B (NF- κ B). N-3 MK inhibují syntézu NF- κ B v jádře a tím snižují produkci prozánětlivých eikosanoidů a cytokinů (Jump *et al.*, 2013).

3.2.1 Jaderný faktor kappa B – NF-κB

NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) byl poprvé identifikován v roce 1986 jako transkripční faktor B lymfocytů, který se váže na enhancer (zesilovač) pro gen kódující lehký κ řetězec imunoglobulinů (Sen a Baltimore, 1986). Jedná se o proteinový komplex, který reguluje transkripci DNA. Vyskytuje se téměř ve všech savčích buňkách, kde má klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi na infekci, označuje se proto za centrální mediátor imunitní odpovědi (Pahl, 1999). Jedná se o nejvíce prostudovaný transkripční faktor v savčích buňkách.

NF-κB je označení pro skupinu homo- či heterodimerů složených z členů rodiny NF-κB/Rel – NF-κB1 (též p50), NF-κB2 (p52), c-Rel, Rel-A (p65) a Rel-B. V monomerní formě jsou tyto proteiny neaktivní. Aby se mohly vázat na DNA a regulovat její expresi, musí vytvořit dimery (Graham a Gibson, 2005). Nejčastější heterodimer je NF-κB1/Rel-A (p50/p65).

Důležitými regulátory transkripčních faktorů NF-κB jsou jejich inhibitory IκB, které je udržují v neaktivním stavu, dokud buňka nepřijme signál k aktivaci. IκB jsou proteiny, které se vážou na NF-κB a překrývají tak vazebné místo pro jaderný lokalizační signál – NLS (*nuclear localization signals*). Tyto neaktivní formy NF-κB se vyskytují v cytoplazmě a svojí aktivací (odkrytím NLS) jsou schopné přejít do jádra, kde řídí genovou expresi cílových genů, které obsahují vazebná místa pro NF-κB (Gilmore, 2006).

Aktivace NF-κB je spojována se zvýšenou transkripcí genů kódujících chemokiny a prozánětlivé cytokiny, jako jsou například TNF-α a IL-1β (Lee *et al.*, 2004). Po ukončení imunitní reakce vstupují do jádra nově syntetizované inhibitorové proteiny IκB, vážou se na jaderný NF-κB a v neaktivní formě ho transportují zpět do cytoplazmy (Hoffmann *et al.*, 2006).

Pro organismus je tedy tento TF nezbytný, jelikož podporuje přirozenou imunitu (dozrávání B lymfocytů, produkce cytokinů) a přežití buněk. Ovšem změny v regulaci NF-κB, kdy je tento TF v neustálé aktivní formě, se podílí na rozvoji chronického zánětu a onemocnění s ním spojených – ateroskleróza, astma, revmatoidní artritida, autoimunitní či nádorová onemocnění (Yamamoto a Gaynor, 2001). Řada přírodních (například i EPA a DHA), ale i synteticky vyrobených látek, které mají protizánětlivé účinky na organismus, tlumí zánět právě tím, že modulují signální dráhy NF-κB a inhibují ho (Fakhrudin *et al.*, 2013).

3.2.2 Receptor spřažený s G proteinem – GPR120

Receptor GPR120, označovaný rovněž jako FFAR (free fatty acid receptor), patří do skupiny receptorů (GPCR – G protein-coupled receptors) přítomných na cytoplazmatické membráně buněk, které na vnitrobuněčné straně membrány asociují s G proteinem. G protein je důležitou složkou vnitrobuněčné signalizace (King *et al.*, 2006). Přenos signálu pomocí GPCR receptorů je jedním z nejrozšířenějších přenosů signálu z vnější strany membrány směrem dovnitř buňky. Nejprve se na receptor naváže ligand, tato vazba aktivuje G protein na druhé straně membrány. G protein se následně odloučí od receptoru, putuje cytosolem, kde aktivuje zpravidla jiný enzym.

GPR120 (G protein-coupled receptor 120) je kódován genem *GPR120* umístěným v lidském genomu na dlouhém raménku chromozomu 10 (10q23.33; zdroj: EntrezGene 1) a u potkanů na dlouhém raménku chromozomu 1 (1q53; zdroj: EntrezGene 2). GPR120 je exprimován převážně v endokrinních buňkách (například játra), částečně i v distální části tenkého a tlustého střeva (King *et al.*, 2006). Jak již název FFAR napovídá, tento receptor interaguje s volnými mastnými kyselinami. Receptor GPR120 se podílí na vnímání chuti tuků (převážně kyseliny linolové a olejové) jelikož je součástí chuťových pohárků (DiPatrizio, 2014). Snížená exprese receptoru GPR120 je zodpovědná za snížený metabolismus lipidů, což by vedlo k obezitě (Ichimura *et al.*, 2012).

Jako receptor volných n-3 PUFA hraje GPR120 rovněž významnou roli ve zprostředkování protizánětlivé odpovědi (Young *et al.*, 2010). Protizánětlivý účinek EPA/DHA prostřednictvím receptoru GPR120 může být rovněž modulován přes inhibici signální dráhy transkripčního faktoru NF-κB (viz obr. 7), kdy dojde ke snížení hladiny prozánětlivých cytokinů (Calder, 2012).

3.2.3 Receptory pro adiponektin – AdipoR1, AdipoR2

Adiponektin (rovněž nazývaný AdipoQ či GBP-28) je hormon, který je tvořen v adipocytech, tedy v buňkách tukové tkáně. Řadí se do početné skupiny adipokinů, proteinů tvořených adipocyty. Adiponektin je nejhojněji produkován tukové tkáně, jeho vysoká koncentrace je hlavně v krevním séru (5-10 mg/l; Novotný *et al.*, 2008). Je zapojen do regulace hladiny glukózy v krvi a hraje klíčovou roli ve vztahu k obezitě, diabetu mellitus II. typu či inzulinové rezistenci (Shimada *et al.*, 2004),

kde adiponektin působí jako ochranný faktor organismu proti těmto klinickým změnám. U pacientů trpících obezitou je tedy hladina adiponektinu snížena.

Adiponektin je polypeptid složen z 244 aminokyselin. Gen *ADIPOQ* kódující tento protein je u lidí lokalizován na chromozomu 3 v lokusu 3q27 (EntrezGene 3), u potkana na chromozomu 11 v lokusu 11q23 (EntrezGene 4).

V roce 2003 byly identifikovány sekvence DNA kódující dva receptory pro adiponektin – AdipoR1 a AdipoR2 (Yamauchi *et al.*, 2003). AdipoR1 je kódován genem *ADIPOR1* na lidském chromozomu 1, v lokusu 1q32.1 (EntrezGene 5) a u potkanů na 13. chromozomu v lokusu 13q13 (EntrezGene 6). Naproti tomu AdipoR2 je kódován genem *ADIPOR2* na lidském chromozomu 12, v lokusu 12q13.31 (EntrezGene 7) a u potkanů na 4. chromozomu v lokusu 4q42 (EntrezGene 8).

Tyto receptory jsou exprimovány v převážné většině tkání organismu, nejvíce však v kosterních svalech, kde se vyskytuje hlavně AdipoR1 a v játrech, kde se naopak exprimuje hlavně AdipoR2 (Yamauchi *et al.*, 2003). Receptory AdipoR1 a AdipoR2 jsou strukturálně podobné G proteinu, jejich funkce je však velmi odlišná. Po navázání adiponektinu na receptory se aktivují početné signální dráhy v buňce, především prostřednictvím transkripčního faktoru PPAR α , PPAR γ (Fang a Sweeney, 2008) či enzymu AMP-aktivované proteinové kinázy (AMPK; protein kináza aktivovaná adenosinmonofosfátem), který zodpovídá za regulaci energetické homeostázy buňky (Carling *et al.*, 2008). AMPK rovněž zvyšuje utilizaci glukózy a MK v játrech a kosterním svalstvu za současné inhibice glukoneogeneze v játrech (Ouchi *et al.*, 2011).

Adiponektin prostřednictvím vazby s receptory AdipoR1 a AdipoR2 působí jako ochranný faktor při vzniku aterosklerózy, jelikož má protizánětlivé a protiaaterogenní vlastnosti (Shimada *et al.*, 2004). Adiponektin inhibuje transkripční faktor NF- κ B pomocí signální dráhy AMPK (Flock *et al.*, 2013; viz Obr. 7) a snižuje expresi a aktivitu TNF- α a IL-6, tedy prozánětlivých cytokinů (Busso *et al.*, 2002).

Aktivace TF PPAR γ (viz další kapitola) zvyšuje hladinu plazmatického adiponektinu a expresi jeho receptorů (Tsuchida *et al.*, 2005). EPA a DHA působí v organismu protizánětlivě mimo GPR120 právě i aktivací signální dráhy PPAR γ . Protizánětlivý účinek EPA/DHA prostřednictvím receptorů AdipoR1 a AdipoR2 může být vysvětlen tak, že aktivovaný PPAR γ působí jako agonista pro zvýšení aktivity adiponektinu (Flock *et al.*, 2013).

3.2.4 Receptory aktivované proliferátory peroxizomů – PPAR

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR) jsou jaderné receptorové proteiny, které fungují jako transkripční faktory a řídí (regulují) expresi řady genů. Z molekulárního hlediska představují PPAR rodinu ligandem aktivovaných jaderných hormonálních receptorů, které hrají zásadní roli v regulaci buněčné diferenciaci, vývoje a metabolismu sacharidů, proteinů a lipidů u eukaryotických organismů (Michalik *et al.*, 2006). Po interakci se specifickými ligandy jsou PPAR translokovány do jádra, kde mění svou strukturu a regulují transkripci genu (Rogue *et al.*, 2010). PPAR jsou v současnosti vnímány jako jakési koordinační uzly signalizačních a metabolických drah, jejichž narušení se projevuje ve formě řady onemocnění - obezita, ateroskleróza, hypertenze a další (Haluzík a Svačina, 2005).

PPAR poprvé popsali roku 1990 vědci Issemann a Green u hlodavců, kde byly identifikovány jako receptory indukující proliferaci peroxizomů v buňkách. Peroxizomy jsou orgány vyskytující se ve všech buňkách vyšších organismů, mají zásadní význam při β -oxidaci dlouhých a rozvětvených mastných kyselin. Rozlišujeme 3 izoformy těchto receptorů kódované třemi různými geny – PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ (Becker *et al.*, 2006). Tyto 3 typy se od sebe liší rozdílnou distribucí v tkáních, fyziologickou funkcí a specifickými ligandy, které se na ně vážou.

PPAR α je exprimován hlavně v tkáních spojených s metabolismem mastných kyselin – játra, ledviny, srdce, svaly a tuková tkáň. Je transkribován genem *PPARA* na chromozomu 22 (22q12-13.1). PPAR β/δ se vyskytuje převážně v mozku, tukové tkáni a v pokožce, kde má vliv na diferenciaci a proliferaci kůže. Je transkribován genem *PPARB* na chromozomu 6 (6p21.2-21.1). PPAR γ je nejprostudovanějším typem (Michalik *et al.*, 2006).

3.2.4.1 PPAR γ

PPAR γ je jaderný receptor kódovaný genem *PPARG*, který je lokalizován na chromozomu 3p25 (Michalik *et al.*, 2006). Rozlišujeme čtyři izoformy – γ 1, γ 2, γ 3 a γ 4. První izoforma je exprimována téměř ve všech tkáních, hlavně pak v srdci, ve svalech, v tlustém střevě a v ledvinách. Druhý typ se exprimuje převážně v tukové tkáni a třetí v makrofázích, tlustém střevě a bílé i hnědé tukové tkáni. Poslední izoforma se vyskytuje v endoteliálních buňkách (Evans *et al.*, 2004). Všechny izoformy PPAR γ hrají důležitou roli v diferenciaci adipocytů (tukových buněk) a v metabolismu glukózy.

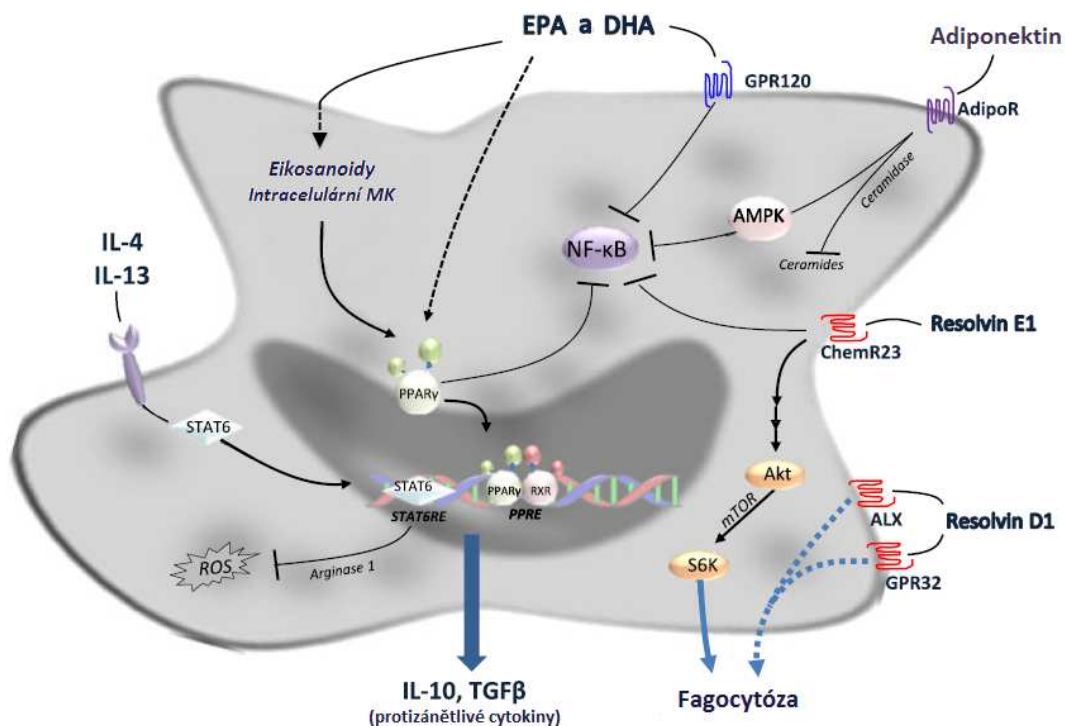
Proteiny produkované z mRNA PPAR γ 1 a γ 3 jsou identické, zatímco produkty z PPAR γ 2 obsahují dodatečnou NH₂-terminální oblast složenou z 30 aminokyselin. Forma PPAR γ 2 je silnější transkripční aktivátor (Feige *et al.*, 2006).

K aktivaci PPAR γ dochází navázáním látky s aktivačním účinkem – PPAR agonista neboli ligand, aktivátor (Haluzík a Svačina, 2005). Ligandem PPAR γ může být celá řada přírodních i uměle syntetizovaných látek. Hlavními přírodními ligandy PPAR γ jsou n-3 a n-6 PUFA (zejména AA, EPA a DHA) a jejich deriváty - eikosanoidy (prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny). Uměle syntetizované ligandy se používají v klinické medicíně k léčbě řady nemocí, jako je například diabetes mellitus II. typu či inzulinová rezistence.

V monomerní formě nejsou PPAR γ schopny regulovat transkripci genů, proto po navázání ligandu tvoří PPAR γ heterodimery s retinoidními receptory X (RXR), které rovněž patří do rodiny jaderných hormonálních receptorů (Rogue *et al.*, 2010). Heterodimery se vážou na specifické sekvence DNA cílových genů a regulují jejich expresi. Tyto sekvence se nachází v promotorové oblasti genu a označují se jako PPAR responzibilní elementy (PPRE - *peroxisome proliferator hormone response elements*). Pořadí nukleotidů v sekvenci PPRE je 5'-AGGTCANAGGTCA-3', kde na místo N může být dosazen jakýkoliv nukleotid. Vazba heterodimeru na PPRE pak vede k aktivaci transkripce specifických genů s následnou syntézou příslušných bílkovin vedoucích k vlastnímu biologickému účinku PPAR (Haluzík a Svačina, 2005). Funkce PPAR γ je regulována řadou koaktivátorů a korepresorů. Jedná se o proteiny, jejichž reakce s heterodimerem stimuluje (koaktivátor), nebo naopak inhibuje (korepresor) funkci receptoru (Michalík *et al.*, 2006).

PPAR- γ hraje důležitou roli v imunitní odpovědi díky své schopnosti inhibovat expresi zánětlivých cytokinů a řídit diferenciaci imunitních buněk, které vedou k prozánětlivé reakci (Majdalawieh a Ro, 2010). Po aktivaci PPAR γ například inhibuje zánětlivou odpověď monocytů a makrofágů tím, že brání aktivaci transkripčních jaderných faktorů, jako je například NF- κ B. Vzhledem k tomu, že zánět hraje důležitou roli v aterogenezi, tento protizánětlivý účinek PPAR γ pomáhá snížit riziko vzniku aterosklerózy (Park *et al.*, 2001).

Agonisté EPA/DHA, jejichž účinek byl zkoumán v experimentální části diplomové práce, snižují zánětlivý stav v organismu mechanismem založeným na aktivaci PPAR γ s důsledkem potlačení signální dráhy NF- κ B (Kostadinova *et al.*, 2005; viz obr. 7).



Obr. 7: Vliv EPA a DHA na utlumení zánětu potlačením signální dráhy NF-κB

EPA a DHA jsou po začlenění do buněčné membrány metabolizovány na protizánětlivé eikosanoidy, které slouží jako ligandy pro PPAR γ (receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory), který přímo reguluje genovou expresi a inhibuje transkripci jaderného faktoru kappa B (NF- κ B). Receptor spřažený s G proteinem (GPR120) funguje jako EPA/DHA receptor na buněčném povrchu. Po aktivaci inhibuje NF- κ B. Adiponektin vylučovaný z adipocytů se váže na receptor AdipoR a rovněž inhibuje NF- κ B pomocí protein kinázy aktivované adenosinmonofosfátem (AMPK). Upraveno podle Flock et al., 2013.

3.2.5 Housekeepingový gen *ACTB* – β -aktin

Housekeepingové geny, známé rovněž jako referenční či provozní geny, zajišťují životně důležité biochemické procesy každé buňky. Jedná se o konstitutivní geny, které se exprimují ve všech buňkách organismu za normálních i patofyziologických podmínek. Právě vzhledem k potřebě jejich stálé exprese mohou tyto geny sloužit jako housekeepingové. Mezi základní metody využívající stabilní exprese housekeepingových genů patří metoda qPCR (Livak a Schmittgen, 2001).

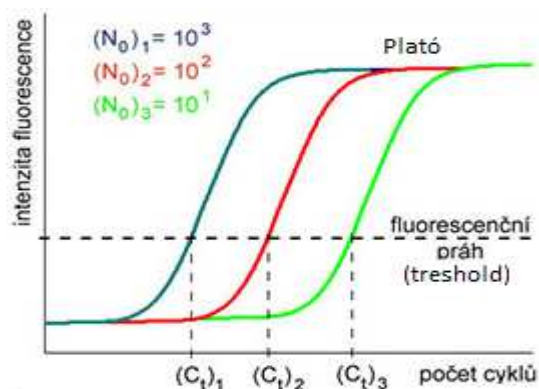
Při výběru housekeepingových genů pro experimentální část této práce bylo analyzováno několik typů konstitutivních genů. Nejstabilnější z nich byl gen *ACTB*, který kóduje protein β -aktin. Jedná se o jednu ze šesti izoform bílkoviny aktinu, která je základní složkou buněčného cytoskeletu a ve svalových buňkách se účastní svalové kontrakce. Isoforma β -aktin se vyskytuje jak v cytoskeletu, tak v buněčném jádře a je nejprostudovanější izoformou aktinu.

3.3 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (*quantitative real-time PCR*; qPCR) je laboratorní technika molekulární biologie založena na klasické PCR, která se používá ke zmnožení a navíc k detekci a kvantifikaci cílené DNA molekuly (Fraga *et al.*, 2008). U klasické PCR je amplifikovaný produkt detekován až po ukončení reakce pomocí gelové elektroforézy, naproti tomu qPCR umožňuje měření zmnoženého produktu již v průběhu reakce, proto tedy v reálném čase. Metoda qPCR je založena na kombinaci detekce a kvantifikace vyzářeného fluorescenčního signálu, kdy je během probíhající reakce kromě cyklického střídání teplot a amplifikace molekuly rovněž detekována intenzita fluorescence, a tím určeno množství vznikajícího PCR produktu (Šmarda *et al.*, 2005). Aby se v průběhu reakce, kdy se zvyšuje množství PCR produktu, zvyšovala i míra fluorescence je třeba zajistit označením syntetizované molekuly DNA/mRNA fluorescenční značkou. Jako fluorescenční značky se používají barviva vázající se na cílovou molekulu DNA/mRNA (např. SYBR Green I), sekvenčně specifické primery nebo různé typy sond (TaqMan, FRET).

Na počátku reakce vzniká jen malé množství produktu a přístroj zachytí pouze náhodný šum – background. S narůstajícím počtem cyklů roste i množství produktu (2^n , n = počet cyklů). Jakmile je hladina fluorescence dostatečná, množství produktu dosáhne fluorescenčního prahu (baseline, treshold) a přístroj zachytí signál. V průběhu dalších cyklů se míra fluorescence zvyšuje, dokud se nevyčerpají všechny složky PCR směsi – fáze „plató“ (plateau, konečná fáze; Fraga *et al.*, 2008). Čím dříve amplifikační křivka překročí fluorescenční práh, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce.

Používané matematické modely pracují s hodnotou zvanou C_T („*threshold cycle*“, počet cyklů), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce (viz obr. 7). S rostoucím počtem kopií počátečního templátu je fluorescence vyzářena dřív a C_T hodnota je nižší (Scheffe *et al.*, 2006)). Počet relativních kopií mezi experimentálním a kontrolním vzorkem může být určen rozdílem mezi jejich C_T hodnotami. Často je obtížné poznat celkové množství DNA v různých vzorcích, proto jsou výsledky testovaného genu normalizovány na referenční (housekeeping) gen, který je neměnný.



Obr. 8: Amplifikační křivka. Upraveno podle *Generi Biotech* (viz internetové zdroje).

Sondy a primery fungují na principu použití fluoroforů - molekul, které absorbují světelnou energii. Dochází k excitaci elektronů, které pak přechází do vyšších energetických hladin. Poté dojde k deexcitaci, kdy se elektrony vrátí na svou základní energetickou hladinu. Přebytečná energie je pak vyzářena ve formě fotonu. Tento jev nazýváme fluorescencí. Pro detekci produktů qPCR se nejčastěji užívají hybridizační sondy, hydrolyzační sondy nebo interkalační barviva.

SYBR Green I je fluorescenční interkalační barvivo, které se váže na menší žlábk dsDNA. S přibývajícím množstvím PCR produktu se zvyšuje i měřený fluorescenční signál (Šmarda *et al.*, 2005). Pozitivem těchto barviv je jejich nízká cena, nicméně nevýhodou je, že se nespecificky vážou na jakoukoliv dsDNA. Během reakce mohou vznikat nespecifické PCR produkty a produkty vzniklé reakcí samotných primerů.

Hydrolyzační sondy, známé pod názvem TaqMan, jsou oligonukleotidy s fluoroforem (nejčastěji FAM) na 5'-konci a zhášecem (nejčastěji BHQ) na 3'-konci. Tyto oligonukleotidy jsou delší než primery a hodnotu T_m (melting time – teplota tání) mají přibližně o 10 °C vyšší. Pokud jsou fluorofor a zhášec v těsné blízkosti, nedochází k emisi fluorescence. Po navázání na DNA se sonda rozloží 5'-3' exonukleázovou aktivitou *Taq* polymerázy, tím se od sebe fluorofor a zhášec vzdálí, následně dojde k emisi fluorescence (Šmarda *et al.*, 2005).

Hybridizační sondy (FRET) jsou dvojice fluorescenčně značených sond, které využívají přenosu energie fluorescenční rezonancí. Jedna sonda je značena donorovým fluoroforem na 3'-konci, druhá akceptorovým fluoroforem na 5'-konci (Šmarda *et al.*, 2005). Pokud jsou od sebe sondy vzdáleny, nedochází k emisi fluorescence. Hybridizací na molekulu DNA/mRNA k sobě obě sondy těsně přisednou, tím dojde k předání energie z donoru na akceptor za současného vyzáření fluorescence.

Určení množství molekul DNA/mRNA během qPCR je důležité pro diagnostiku klinicky významných patogenů nebo pro detailní studium genové exprese (Šmarda *et al.*, 2005). Ve výzkumu umožňuje tato metoda vysoce citlivé kvantitativní měření genové transkripce, stanovení změn genové exprese zkoumaného genu v čase jako odpověď buněk na podání léku nebo jako reakce na změnu podmínek prostředí či diferenciaci buněk (Dudová a Hájek, 2008).

Analýza genové exprese metodou qPCR vyžaduje normalizaci dat pomocí referenčního (housekeeping) genu, který je neměnný – je exprimován ve všech buňkách za standardních i patologických podmínek (Kozera a Rapacz, 2013). Výběr vhodného referenčního genu je důležitý, aby se zabránilo nesprávné kvantifikaci cílového genu.

3.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie patří mezi metody analytické chemie pro separaci a analýzu látek obsažených v biologických vzorcích. Při této metodě dochází k oddělení jednotlivých složek obsažených ve vzorku a jejich převedení do plynné fáze aniž by došlo k jejich rozkladu (Klouda, 2003).

Metoda je založena na rozdílných schopnostech jednotlivých složek vzorku poutat se na stacionární (nepohyblivou) fázi. Vzorek je v části zvané injektor (dávkovač) vpraven do proudu nosného plynu, kde je následně odpařen a unášen kolonou (mobilní, pohyblivá fáze). V koloně dochází k separaci jednotlivých složek vzorku na základě rozdílné interakce se stacionární fází, která je při pohybu zpomaluje (Klouda, 2003). Na konec stacionární fáze se tedy dostávají dříve ty složky, které s touto fází neinteragují (nepoutají se na ni). Jednotlivé složky následně opouštějí kolonu a jsou identifikovány pomocí detektoru. Signál z detektoru se zpracuje na vyhodnocovacím zařízení a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení jednotlivých složek.

Před stanovením mastných kyselin je vhodné vzorky nejprve derivatizovat v alkalickém prostředí, aby došlo ke vzniku methylesterů MK, které jsou těkavější než volné MK a tedy vhodnější pro stanovení metodou plynové chromatografie (Ostermann *et al.*, 2014).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Krmná část experimentu

Výzkum se prováděl v experimentálním zařízení Ústavu výživy zvířat a pícninářství Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Experiment probíhal v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. ve znění zákona č. 162/1993 Sb. Dále byl schválen „Komisí na ochranu zvířat proti týrání“ Mendelovy univerzity v Brně.

Jako modelový organismus byl zvolen samec laboratorního potkana outbredního kmene Wistar albino z chovu společnosti Bio Test s.r.o. v Konárovicích. Bylo použito 40 samců ve stáří 10 týdnů o průměrné počáteční hmotnosti 296 ± 3 g. Potkani byli rozděleni do čtyř experimentálních skupin po deseti jedincích. Dále byli po pěti kusech umístěni do plastových boxů o rozměrech $53.5 \times 32.5 \times 30.5$ cm opatřených kovovou mřížkou, nádržkou na vodu a krmítkem. Po dobu experimentu byly v místnosti s boxy následující podmínky: teplota = 23 ± 1 °C, vlhkost = 60 % a světelný režim 12/12 h světlo/tma při maximální intenzitě světla 200 lx.

Prvních sedm týdnů experimentu bylo všech 40 potkanů krmeno stejnou směsí za účelem navození obezity a vzniku nízkého stupně chronického zánětu organismu. Krmná směs obsahovala MYPO (kompletní krmná směs pro myši a potkany) od firmy Biokron v Blučině, kondenzované slazené mléko (Salko) od firmy Tatra, hovězí lůj a premix (vitaminy a minerály) v množství $380 + 400 + 200 + 20$ g · kg⁻¹. Složení MYPO je následující: pšenice, oves, pšeničné klíčky, sojová moučka, extrudovaná sója, kukuřice, sušené mléko, sušená syrovátka, sušené kvasnice, mletý vápenec, monokalciumfosfát, sůl a L-lysin hydrochlorid.

Po sedmi týdnech byli potkani rozděleni do čtyř skupin - T, S, F, A. Kontrolní skupina byla označena jako T (tallow = lůj). Potkanům skupiny T bylo po celou dobu experimentu (7 + 7 týdnů) podáváno stejné krmivo (obsah nasycené kyseliny palmitové a kyseliny stearové z celkového množství mastných kyselin byl 55,4 %). Ostatní skupiny byly po zbývajících 7 týdnů krmeny základní krmnou směsí MYPO s přísadkou příslušného oleje (6 % z celkového množství krmiva). Skupině S (safflower = světlice) byl po dalších 7 týdnů do krmiva přidáván olej ze světlice barvířské v množství 60 g · kg⁻¹ (obsah n-6 polynenasycené mastné kyseliny linolové byl 65,7 %). Skupina F (fish oil = rybí olej) dostávala krmivo s přísadkou rybího oleje

(*Jecoris aselli oleum*, 60 g · kg⁻¹). Obsah EPA byl 8,4 %. Poslední skupině značené A (alga = řasa) byl ke krmivu přimíchán olej získaný z řasy *Schizochytrium* (DHASCO-rostlinný olej z řas, DSM Nutritional Products North Amerika, Parsippany, NY, USA) v množství 60 g · kg⁻¹. Obsah DHA byl 29,1 %. Množství živin a metabolizovatelné energie v 1 kg krmiva u jednotlivých skupin je uvedeno v tab. 2.

Tab. 2: Množství živin a metabolizovatelné energie v 1 kg krmiva. NFE (nitrogen-free extractives) – bezdusíkaté látky výtahové

	Protein g	Tuk g	Vláknina g	NFE g	Energie MJ · kg⁻¹
S, F, A	228	85	48	639	15,8
T	145	208	26	621	18,9

Krmivo se podávalo ve formě koule o hmotnosti 200 g. Potkani byli krmeni a napájeni každý den *ad libitum*. Denně se zaznamenávala spotřeba krmiva, v týdenních intervalech pak přírůstek/úbytek hmotnosti každého potkana zvlášť.

4.2 Chemická část experimentu

Po ukončení experimentu (7 + 7 týdnů a 12 hodinové vylučení) byli potkani uvedeni do narkózy pomocí inhalačního anestetika Isofluran a punkcí perikardu byly odebrány vzorky krve do heparinových zkumavek. Následně byli potkani humánně utraceni zvýšením dávky Isofluranu a byly odebrány vzorky jater a viscerální (epididymální) tukové tkáně pro další analýzy.

4.2.1 Stanovení koncentrace glukózy v krvi – glykémie

Koncentrace glukózy v krevní plasmě (glykémie) byla stanovena enzymaticko-kolorimetrickou metodou pomocí automatizovaného chemického analyzátoru BS400 (Mindray, Čína) a komerčních kitů (Greiner Diagnostic GmbH, Německo).

4.2.2 Stanovení mastných kyselin v krmivu a ve tkáních

Ze vzorků viscerální tukové tkáně a jater byla lyofilizací odstraněna volná i vázaná voda z důvodu zvýšení výtěžnosti lipidů při extrakci. Poté byly vzorky homogenizovány v mixéru (Moulinex model D56, Francie) a přeneseny do Erlemayerovy baňky o objemu 150 ml. Při samotné extrakci MK se k jednotlivým

vzorkům přidalo 30 ml směsi rozpouštědel HIP 1 (hexan/2-propanol v poměru 3:2) a směs byla následně umístěna do ultrazvukové lázně PS10000 (Notus-Powersonic, Vrábce, Slovakia) na 15 min. Získaný extrakt se zfiltraval přes Büchnerovu nálevku a k filtrátu se přidalo 24 ml roztoku Na₂SO₄ (síran sodný). Po protřepání a úplném oddělení jednotlivých vrstev v dělicí nálevce se vrstva n-hexanu přefiltrovala přes 0,5 g bezvodého Na₂SO₄ do extrakční baňky. Vodná vrstva se extrahovala v 10 ml HIP 2 (hexan/2-propanol v poměru 7:2). Vrstva n-hexanu se po re-extrakci rovněž přefiltrovala do extrakční baňky. Rozpouštědlo bylo ze vzorku odpařeno na rotační vakuové odparce (RV 05-ST 1P-B model, IKA Labortechnik, Staufen, Německo) při teplotě 40 °C. Zbytky rozpouštědla byly ze vzorku odstraněny pomocí dusíku. Lipidy byly stanoveny gravimetricky.

Následně byly vzorky derivatizovány v alkalickém prostředí, aby došlo ke vzniku methylesterů MK (FAME – *fatty acid methyl ester*), které jsou těkavější než volné MK a tedy vhodnější pro stanovení metodou plynové chromatografie. 50 mg extrahovaných lipidů se smíchalo s 3 ml vnitřního standardu (15:0) a 1 ml butylhydroxytoluenu pro prevenci oxidace MK a směs byla na 5 min. umístěna v ultrazvukové lázni. Dále byly přidány 2 ml 0,5M methanolátu sodného CH₃ONa (1,15 g Na/100 ml metanolu) a směs se následně zahřívala pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 60 °C po dobu 5 min. Přes zpětný chladič byly přidány 2 ml 14% methanolického roztoku fluoridu boritého BF₃ a opět se směs zahřívala po dobu 5 min. Po ochlazení se přidaly 2 ml isooktanu a 5 ml nasyceného vodného roztoku NaCl. Směs se důkladně protřepala (15 s). Po vychladnutí došlo k oddělení organické vrstvy, která byla odebrána (5 ml) do vialky pro následné stanovení MK v plynovém chromatografu.

Stanovení MK probíhalo na plynovém chromatografu HP 6890 (Hewlett-Packard) na kapilární koloně Innowax (30 mm x 0,25 mm x 0,25 mm; Agilent Technologies, J & W Scientific, Santa Clara, CA, USA). Injektor byl vyhříván na 260 °C a detektor (FID) na 275 °C. Parametry teplotního programu byly: 150 °C/1 min. → nárůst o 10 °C/min. do 200 °C → nárůst o 3 °C/min. do 260 °C → 260 °C po 3 minuty. Nosným plynem byl dusík (N₂) s průtokem 1,0 ml/min., tlak byl 145 kPa a split poměr byl 60:1. Pro identifikaci FAME byl použit standard PUFA No. 2 (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Obdobný postup byl použit i pro stanovení MK v krmivu.

Stanovení MK v rámci projektu IGA prováděla Ing. Barbora Němcová. Podílela jsem se na derivatizaci MK z tukové a jaterní tkáně.

4.3 Molekulárně-biologická část experimentu

4.3.1 Odběr vzorků pro genovou expresi

- RNAlater (Ambion)
- 1,5 ml zkumavky

Do 24 zkumavek s 1 ml RNAlateru se od 4 potkanů (4 · 6 zkumavek) odebraly vzorky jater na optimalizaci (5 · 40-60 mg, 1 · 5-6 ks). Dále byly odebrány vzorky na testování od 40 potkanů po třech zkumavkách (1 · 40-60 mg, 2 · 5-6 ks) a zkumavky se po okraj doplnily RNAlaterem. Velikost vzorku byla max. 0,5 cm. Zkumavky se uložily přes noc při 4 °C, aby RNAlater penetroval do vzorku, poté se zamrazily při -20 °C.

4.3.2 Izolace RNA

- Vzorky jater - 30 mg
- QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA)
- RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen): 1 kolonka/vzorek, pufr RW1, RPE, RNase-free voda, 1 sběrná zkumavka, 1,5 ml zkumavka
- chloroform
- 70% ethanol
- 1 · 2 ml zkumavka/vzorek
- 2 · 1,5 ml zkumavka/vzorek
- homogenizátor FastPrep
- centrifuga (Mikro 200, Hettich)
- chlazená centrifuga (4 °C)

Před vlastní izolací se vzorek vytáhl z RNAlateru, osušil a vložil do lyzačního roztoku. Do 2 ml zkumavky se skleněnými kuličkami se přidal 1 ml QIAzol Lysis Reagentu a 30 mg jater (malé kousky), poté se směs zhomogenizovala ve FastPrepu 2 · 10 s/stupeň 6 a zcentrifugovala 5 min./12 000 rpm (13 684 · g; RCF (*relative centrifugal force*) - relativní centrifugační síla; g = tíhové zrychlení) při 4 °C. Lyzát se přepipetoval do 1,5 ml zkumavky a nechal stát 5 min. při pokojové teplotě – disociace nukleoproteinových komplexů. Poté se přidalo 200 µl chloroformu, protřepalo a opět nechalo 2-3 min. při pokojové teplotě. Směs se zcentrifugovala 15 min./13 000 rpm

(16 060 · g) při 4 °C, poté se horní vodná fáze napipetovala do 1,5 ml zkumavky a přidal se 70% etanol v poměru 1:1 a směs se zvortexovala.

700 µl směsi se přeneslo do kolonky umístěné ve sběrné zkumavce, která se zcentrifugovala 15 s/10 000 rpm (9 503 · g) při pokojové teplotě. Tento krok se opakoval do vyčerpání směsi. Poté se do kolonky napipetovalo 700 µl pufru RW1 a zcentrifugovalo 15 s/10 000 rpm (9 503 · g). Dále se do kolonky napipetovalo 500 µl pufru RPE a zcentrifugovalo 15 s/10 000 rpm (9 503 · g). Opět se napipetovalo 500 µl pufru RPE a zcentrifugovalo 2 min./10 000 rpm (9 503 · g).

Kolonka se vložila do čisté 2 ml sběrné zkumavky (součást kitu) a dodatečně zcentrifugovala 1 min./13 000 rpm (16 060 · g). Poté se kolonka vložila do 1,5 ml zkumavky a přidalo se 30-50 µl RNA-free vody a zcentrifugovalo 1 min./10 000 rpm (9 503 · g). Znovu se napipetovalo do kolonky 30-50 µl RNA-free vody a zcentrifugovalo 1 min./10 000 rpm (9 503 · g). Konečný izolát se uchovával při -80 °C.

4.3.3 Elektroforetická kontrola izolace RNA

- 10x FA pufr
- 37% formaldehyd (12,3 M)
- Ethidium bromid (0,5 mg/ml)
- Agaróza
- Destilovaná voda (ddH₂O)
- 5x RNA nanášecí pufr
- Vanička na gel
- Elektroforetická vana + zdroj

Pomocí elektroforézy na 1,2% agarózovém gelu se ověřilo, zda izolace RNA proběhla v pořádku. Gel se připravil následovně:

Nejprve se smíchalo 0,6 g agarózy, 5 ml 10x FA pufru a 45 ml destilované vody. Směs se zamíchala, rozvařila a zchladila na 65 °C. Poté se ke směsi přidalo 0,9 ml formaldehydu a 12,0 µl ethidium bromidu (0,5 mg/ml). Směs se nalila do vaničky na gel a nechala se ztuhnout. Následně se gel vložil do elektroforetické vany a zalil se 1000 ml 1x FA puftrem a nechal se 30 min. odstát.

Mezitím se vzorky smíchaly s 5x RNA nanášecím pufrem, nechaly se inkubovat po dobu 3-5 min. při 65 °C. Po ochlazení se vzorky nanesly na gel a spustila se elektroforéza.

příprava 10x FA pufru (250 ml):

Ke 200 ml vody se přidalo 10,465 g MOPSu (3-morfolinpropansulfonová kyselina; c = 200 mM), 1,701 g octanu sodného (c = 50 mM) a 5 ml EDTA (500 mM) o pH 8. Směs se rozmíchala a doplnila vodou do 250 ml. Pomocí NaOH se upravilo pH na 7.

příprava 1x FA pufru (1000 ml):

Ke 100 ml 10x FA pufru se přidalo 20 ml formaldehydu a 880 ml vody, poté se směs důkladně promíchala.

příprava 5x RNA nanášecího pufru:

Na přípravu 10 ml nanášecího pufru se smíchalo 16 µl bromfenolové modře, 80 µl EDTA, 720 µl 37% formaldehydu, 2 ml 100% glycerolu, 3,084 ml formamidu, 4 ml 10x FA pufru a 0,1 ml RNase-free vody.

4.3.4 Reverzní transkripce mRNA

- izolovaná RNA
- Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen): 10 x RT pufr, dNTP mix, Reverse Transcriptase, RNase-free voda
- oligo dT primery
- inhibitor RNáz

V PCR zkumavce uložené na ledu se smíchaly všechny reakční složky dle tab. 3, které se následně nechaly inkubovat 60 min. při 37 °C. Vzniklá cDNA se zamrazila při -20 °C pro další analýzy.

Tab. 3: Reakční složky pro reverzní transkripci mRNA.

Reakční složka	objem
H ₂ O	do 20 µl
10x RT pufr	2,0 µl
dNTP mix (5M každý)	2,0 µl
oligo dT (10 µM)	2,0 µl
inhibitor RNáz (10 U/µl)	1,0 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1,0 µl
RNA	množství odpovídající 1 µg
celkem	20 µl

4.3.5 PCR v reálném čase

- cDNA
- Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
- UNG (Uracil-N-glykosyláza) - AmpErase® Uracil N-glycosylase (Applied Biosystems)
- primery (10 pmol/µl)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- pipety + špičky s filtrem

Ve zkumavce se smíchaly všechny reakční složky dle tab. 4. Směs se poté analyzovala v přístroji 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Ke každému páru primerů byla provedena negativní kontrola. Výsledek se ověřil gelovou elektroforézou. Specifita každého PCR fragmentu byla ověřena sekvenováním v přístroji ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) za použití BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu.

Tab. 4: Reakční složky pro PCR v reálném čase.

Reakční složka	objem
H ₂ O	8,4 µl
UNG	0,2 µl
SYBR Green	10,0 µl
mix primerů	0,4 µl
cDNA	1,0 µl
celkem	20 µl

Teplotní profil reakce:

Cílové geny: 2 min./50 °C, 10 min/95 °C – 40 cyklů po 15 s/95 °C + 1 min/60 °C

Actb: 2 min./50 °C, 10 min/95 °C – 40 cyklů po 15 s/95 °C + 30 s/65 °C + 30 s/60 °C

Program denaturace: 1 cyklus 15 s/95 °C + 1 min./60 °C + 30 s/95 °C + 15 s/60 °C

Sekvence přímého a zpětného primeru u jednotlivých genů:

GPR120:

přímý: 5'-CCCAACCGCATAGGAGAAATC-3'

zpětný: 5'-ACACTCGGATCTGGTGGCTCT-3'

AdipoR1:

přímý: 5'-GATGTTCTTCCTGGGTGCAGTG-3'

zpětný: 5'-CAGAGATGCCCAGGACACAGAC-3'

AdipoR2:

přímý: 5'-ATCTGTGTGCTGGGCATTGC-3'

zpětný: 5'-AGCCAGCCTATCTGCCCTATG-3'

Housekeepingový gen *ACTB* – β-aktin:

přímý: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'

zpětný: 5'-GTTTCATGGATGCCACAGGATT-3'

Primery pro cílové geny navrhoval Bc. Ing. Ondřej Škultéty a pro gen *ACTB* prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

4.4 Statistické vyhodnocení

Vzorec pro vypočítání genové exprese:

$$R = \frac{(1 + E_{CG})^{\Delta C_T - CG(\textit{kontrola} - \textit{vzorek})}}{(1 + E_{HG})^{\Delta C_T - HG(\textit{kontrola} - \textit{vzorek})}}$$

Použité zkratky:

R = relativní vyjádření exprese vůči kontrole (%)

E_{CG} = efektivita (účinnost) qPCR reakce pro cílový gen

E_{HG} = efektivita (účinnost) qPCR reakce pro housekeepingový gen

- Jako hodnotu E jsme uvažovali efektivitu optimální = 1

$\Delta C_T(\textit{kontrola} - \textit{vzorek})$ = rozdíl C_T hodnot u kontrolní a experimentální skupiny pro daný gen

Výsledky relativní exprese genů byly vyhodnoceny pomocí softwaru qbase+ (Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgie). Rozdíly v úrovni exprese byly posuzovány metodou analýzy rozptylu (ANOVA; Statistica 12, StatSoft Inc., Tulsa, USA) pomocí jednostupňového třídění analýzy rozptylu včetně zjištění kontrastů Tukeyovým testem.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Příjem krmiva a hmotnost potkanů

Příjem krmiva u kontrolní skupiny (T) činil (za celou skupinu) průměrně 115 g.den^{-1} , u skupiny s přidavkem oleje ze světlice barvířské (S; zdroj LA) to bylo 156 g.den^{-1} , u skupiny s přidavkem rybího oleje (F; zdroj EPA) byl příjem krmiva 151 g.den^{-1} a u skupiny s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium* (A; zdroj DHA) to bylo 135 g.den^{-1} (Tab. 6).

Počáteční průměrná hmotnost potkanů byla $296 \pm 3 \text{ g}$. Na konci 7. týdne, tedy před rozdělením do skupin podle diety, byla jejich průměrná hmotnost $464 \pm 3 \text{ g}$ bez významných rozdílů mezi jednotlivými boxy s potkany ($P > 0,05$). Na konci experimentu byly průměrné hmotnosti potkanů u kontrolní skupiny (T) $583 \pm 13 \text{ g}$, u S diety $560 \pm 7 \text{ g}$, u F diety $557 \pm 9 \text{ g}$ a u A diety $502 \pm 10 \text{ g}$ (tab. 5). Průměrný denní přírůstek hmotnosti potkanů od nasazení diety byl u kontrolní skupiny (T) $1,79 \pm 0,1 \text{ g}$, u S diety $1,52 \pm 0,1 \text{ g}$, u F diety $1,81 \pm 0,1 \text{ g}$ a u A diety $1,28 \pm 0,1 \text{ g}$ (tab. 6).

Pouze extrakt z řasy *Schizochytrium* (dieta A) průkazně ($P < 0,05$) snížil konečnou hmotnost potkanů, a to nejen oproti kontrole (T), ale i oproti dietám F a S (Graf 1). Kyselina dokosaheptaenová tedy může mít vliv na snížení mírné obezity, což potvrzuje i nižší hmotnost tukové tkáně skupiny A ($9,7 \text{ g}$) oproti kontrole ($15,1 \text{ g}$).

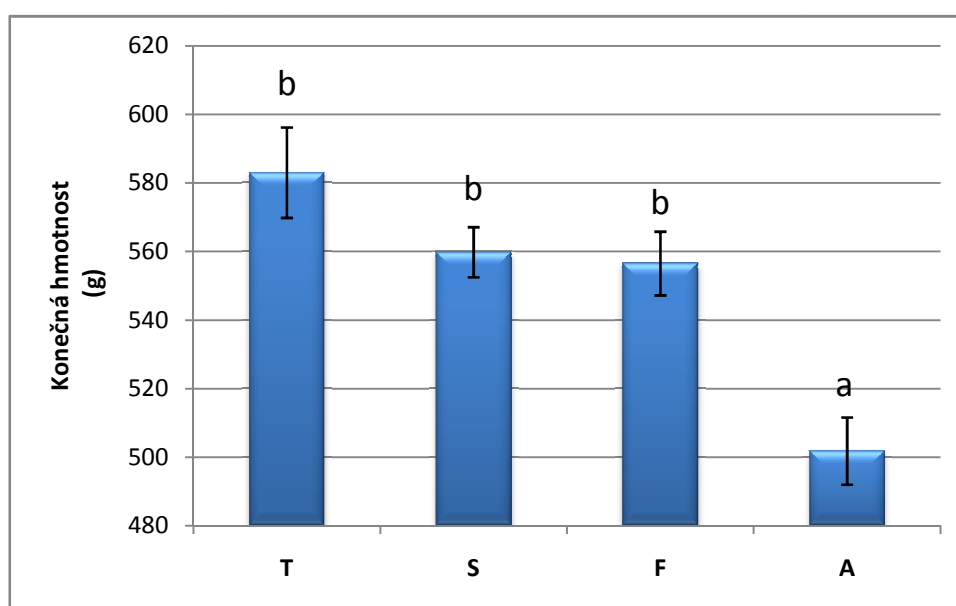
Průměrný denní přírůstek hmotnosti potkanů skupiny A byl průkazně nižší ($P < 0,05$) oproti kontrole (T) i oproti potkanům krmených dietou s přidavkem rybího oleje (dieta F; Graf 2). U skupiny S byl sice denní přírůstek hmotnosti nižší oproti kontrole (T), ovšem tato hodnota není statisticky průkazná ($P > 0,05$; Graf 2).

Tab. 5: Hmotnost (m) potkanů v průběhu experimentu.

Skupina	Počáteční hmotnost (g)	m před rozdělením (g)	Δ R-P (g)	Konečná hmotnost (g)	Δ K-R (g)
T	300 ± 8	486 ± 8,5	185,6 ± 13	583 ± 13	97 ± 7
S	294 ± 6	478 ± 6	184 ± 6	560 ± 7	81 ± 6
F	295 ± 7	459 ± 9	164 ± 8	557 ± 9	98 ± 3
A	294 ± 4	432 ± 7	138 ± 5	502 ± 10	70 ± 3

Pozn. - průměr ± střední chyba průměru

Δ R-P – rozdíl mezi počáteční hmotností a hmotností před rozdělením do dietárních skupin, Δ K-R – rozdíl mezi hmotností před rozdělením a konečnou hmotností, **T** - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy *Schizochytrium*



Graf 1: Hmotnost potkanů na konci experimentu.

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy *Schizochytrium*

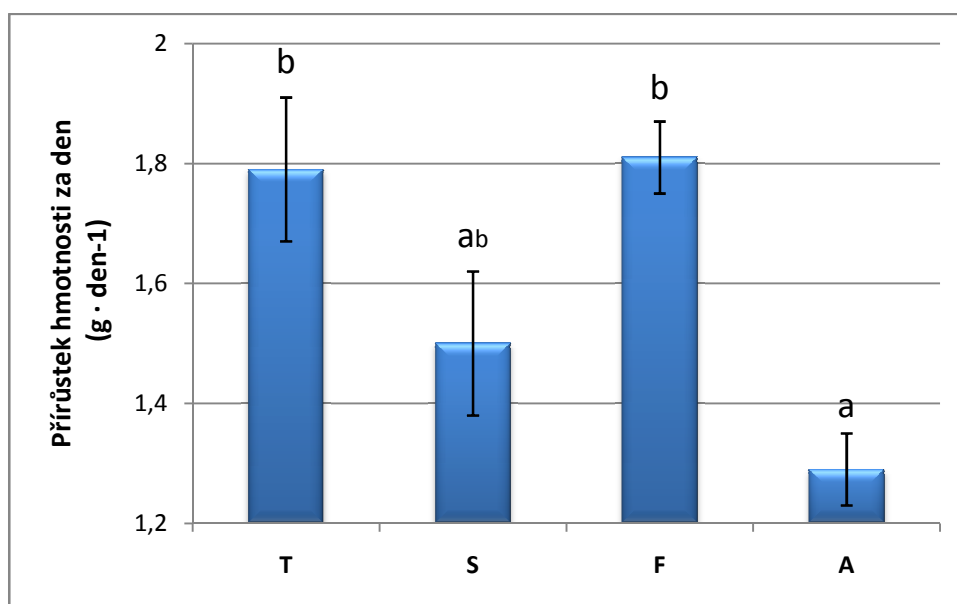
a, b – hodnoty označené různými písmeny se od sebe liší na hladině významnosti $P < 0,05$, měřeno pomocí jednostupňového třídění analýzy rozptylu (ANOVA) včetně zjištění kontrastů Tukeyovým testem

Tab. 6: Přírůstky hmotnosti potkanů, denní příjem krmiva (DPK) a hmotnost tkání.

Skupina	Přírůstek P-R (g)	Přírůstek R-K (g)	DPK-S (g)	DPK-J (g)	m jater (g)	m tuku (g)
T	3,6 ± 0,3	1,79 ± 0,1	115	23	17,5 ± 0,6	15,1 ± 1,0
S	3,6 ± 0,1	1,52 ± 0,1	156	31,2	16,4 ± 0,3	11,1 ± 0,7
F	3,2 ± 0,2	1,81 ± 0,1	151	30,2	17,5 ± 0,2	11,0 ± 0,6
A	2,7 ± 0,1	1,28 ± 0,1	135	27	16,0 ± 0,5	9,7 ± 0,6

Pozn. - průměr ± střední chyba průměru

Přírůstek P-R – denní přírůstek hmotnosti od počátku experimentu do rozdělení do skupin, **Přírůstek R-K** – denní přírůstek hmotnosti od rozdělení do skupin do konce experimentu, **DPK-S** – denní příjem krmiva za skupinu, **DPK-J** – průměrný denní příjem krmiva za jednotlivce, **m** – hmotnost, **T** - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy Schizochytrium



Graf 2: Přírůstek hmotnosti potkanů za den od rozdělení do skupin do konce experimentu.

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy Schizochytrium

a, b – hodnoty označené různými písmeny se od sebe liší na hladině významnosti $P < 0,05$, měřeno pomocí jednostupňového třídění analýzy rozptylu (ANOVA) včetně zjištění kontrastů Tukeyovým testem

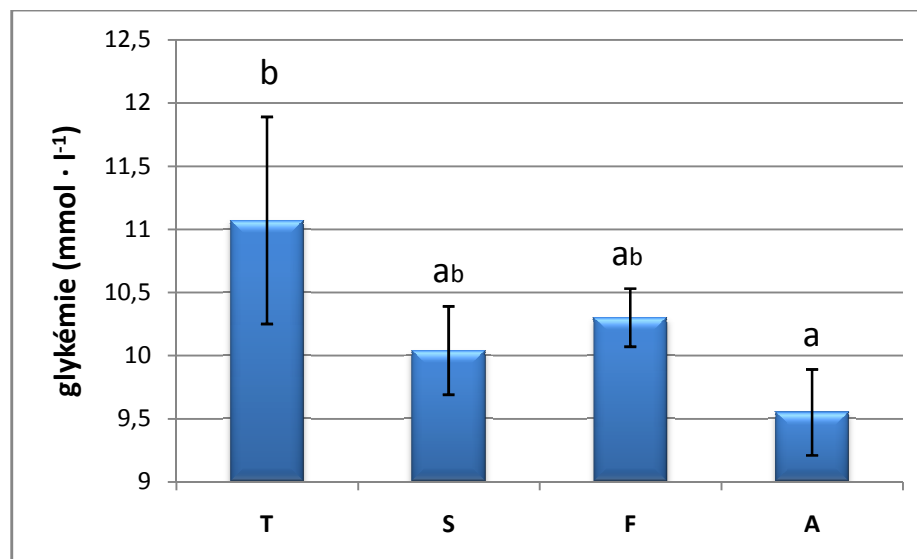
5.2 Stanovení koncentrace glukózy v krvi - glykémie

Předpokládali jsme, že u kontrolní skupiny (T) bude vzhledem k navození mírného stavu obezity koncentrace glukózy v krevní plazmě vyšší oproti experimentálním skupinám S, F, A. U kontrolní skupiny (T) byla hladina glukózy v plazmě $11,07 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. U skupiny s dietou S to bylo $10,04 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, u F diety $10,30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a u skupiny s A dietou $9,55 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Přídavek oleje extrahovaného z řasy rodu *Schizochytrium* (A dieta; zdroj DHA) průkazně ($P < 0,05$) snížil hladinu glykémie oproti kontrole na 85 % (tedy o 15 %) a měl tendenci ($P > 0,05$) snižovat glykémii i ve srovnání s rybím (F dieta; zdroj EPA) i světlicovým (S dieta; zdroj LA) olejem (Graf 3).

Rozvoj stavu mírné obezity u potkanů kontrolní skupiny (T) může být odvozen ze srovnání našich výsledků glykémie (o 9 % vyšší hladina glukózy oproti „neutrální“ skupině S) a konečné hmotnosti potkanů (o 5 % vyšší konečná hmotnost oproti „neutrální“ skupině S) s daty uvedenými ve studii autorů Sakai *et al.* (2013). Tato studie uvádí, že u mírně obézních potkanů se hladina glukózy v krvi zvýšila o 10 % a konečná hmotnost se zvýšila o 6 % oproti skupině, která netrpí obezitou. Skupina S je v naší práci označena za neutrální, jelikož tato dieta měla výrazně nižší obsah metabolizovatelné energie oproti T, ale rovněž neobsahovala EPA a DHA, u kterých se předpokládá, že mají pozitivní vliv na snižování mírné obezity.

Huerta *et al.* (2015) ve své studii podávali denně 1,3 g EPA formou suplementů obézním ženám po dobu 10 týdnů. Autoři průběžně měřili koncentraci glukózy v krvi a došli k závěru, že podávání EPA výrazně snižuje hladinu glykémie oproti kontrolní skupině (obézní ženy, bez EPA suplementace). Tyto výsledky pozitivně korelovaly i s hmotností žen s EPA suplementací, která se rovněž snižovala.



Graf 3: Koncentrace glukózy v krvi potkanů

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); *S* - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; *F* - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); *A* - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy *Schizochytrium*

a, *b* – hodnoty označené různými písmeny se od sebe liší na hladině významnosti $P < 0,05$, měřeno pomocí jedностupňového třídění analýzy rozptylu (ANOVA) včetně zjištění kontrastů Tukeyovým testem

5.3 Stanovení mastných kyselin v krmivu a ve tkáních

Pomocí metody plynové chromatografie byl stanoven obsah kvantitativně a fyziologicky významných mastných kyselin v použitých potravinových zdrojích (hovězí lůj a dietární oleje), v krmivu, ve viscerální (epididymální) tukové tkáni a v játrech.

5.3.1 Stanovení mastných kyselin v krmivu

Procentuální zastoupení kvantitativně a fyziologicky významných mastných kyselin v použitých potravinových zdrojích (hovězí lůj a dietární oleje) u jednotlivých skupin je uvedeno v tab. 7. Procentuální zastoupení kvantitativně a fyziologicky významných mastných kyselin v krmivu jednotlivých skupin pak v tab. 8.

Kontrolní skupina potkanů (*T*) měla stravu bohatou převážně na kyselinu olejovou. Množství EPA a DHA bylo zanedbatelné. Skupina potkanů s dietou *S* měla stravu bohatou na n-6 kyselinu linolovou (LA; 65,7 %), u které se předpokládá, že ještě

zvýší riziko aterosklerózy podmíněnou vznikem mírného chronického zánětu organismu. Množství EPA a DHA ve stravě S skupiny je rovněž minimální. Skupina F dostávala stravu bohatou na n-3 mastnou kyselinu eikosapentaenovou (EPA; 8,4 %). Rovněž zde však byl vysoký podíl kyselin DHA (11,9 %) a LA (19,9). Poslední skupina potkanů s A dietou měla stravu bohatou na n-3 kyselinu dokosahexaenovou (DHA; 29,1 %). Obsah LA v této dietě byl 19,0 % a EPA pouze 2,0 %.

Tab. 7: Procentuální zastoupení mastných kyselin v použitých zdrojích krmných dávek.

Mastné kyseliny		Obsah mastných kyselin v oleji/tuku (% ze sumy MK)			
		Hovězí lůj	Světlice ¹	Rybí olej ²	Microalga ³
Myristová	14:0	2.2	1.2	5.6	6.4
Palmitová	16:0	29.4	9.1	16.3	16.6
Palmitoolejová	16:1	2.5	1.4	9.1	2.9
Stearová	18:0	20.6	3.9	4.1	3.7
Olejová	18:1n-9	40.2	15.0	26.1	17.5
Linolová (LA)	18:2n-6	2.6	62.5	10.5	7.9
Arachidonová	20:4n-6	0.7	1.3	1.8	2.7
α-Linolenová	18:3n-3	0.9	1.2	2.4	2.4
EPA	20:5n-3	0.1	1.3	9.7	2.9
DPA	22:5n-3	ND	1.1	2.2	2.6
DHA	22:6n-3	0.1	2.0	12.2	34.4

1 – olej ze světlice barvířské; 2 – komerční oleum jecoris asseli; 3 – olej z řasy rodu Schizochytrium microalga; ND – nedetekováno

Tab. 8: Procentuální zastoupení kvantitativně a fyziologicky důležitých MK v krmivu.

Mastné kyseliny		Obsah mastných kyselin v krmivu (% ze sumy mastných kyselin)			
		T	S	F	A
Myristová	14:0	4.5	0.5	4.6	4.4
Palmitová	16:0	27.5	10.5	18.2	17.5
Stearová	18:0	27.9	2.9	3.9	2.8
Olejová	18:1n-9	33.7	17.9	26.3	21.6
Linolová (LA)	18:2n-6	5.6	65.7	19.9	19.0
α-Linolenová	18:3n-3	0.8	1.1	4.3	1.7
EPA	20:5n-3	0.0	0.4	8.4	2.0
DPA	22:5n-3	0.0	0.4	2.5	1.9
DHA	22:6n-3	0.0	0.6	11.9	29.1

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); *S* - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; *F* - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); *A* - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy *Schizochytrium*

5.3.2 Stanovení EPA a DHA v tukové tkáni a v játrech

Obsah kvantitativně a fyziologicky významných kyselin EPA a DHA a jejich sumy (EPA + DHA) v epididymální tukové tkáni a v játrech u jednotlivých dietárních skupin je uveden v Tab. 9. Předpokládali jsme, že u skupin T a S bude obsah EPA a DHA nízký. Naopak u F diety se předpokládá zvýšený obsah EPA a u A diety vysoký obsah DHA ve tkáních.

Obsah DHA a následně i obsah sumy EPA+DHA v epididymální viscerální tukové tkáni potkanů krmených dietou A s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium* byl několikanásobně vyšší ($P < 0,05$; Graf 4) ve srovnání s potkany skupiny F (samozřejmě i s potkany skupiny S a potkany kontrolními), což by podle předpokladu mělo vést k vyšší produkci hormonu adiponektinu a následně ke zvýšenému uvolňování tohoto hormonu do krevního oběhu. Tento předpoklad byl potvrzen. Koncentrace adiponektinu v plazmě u A skupiny ($7 \pm 0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) byla výrazně vyšší ($P < 0,05$) oproti skupině S ($5,9 \pm 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) i T ($5,6 \pm 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Koncentrace adiponektinu v plazmě byla v rámci projektu IGA měřena metodou ELISA, tato část však nebyla součástí cílů mé diplomové práce. Rovněž obsah EPA u F diety byl významně vyšší ($P < 0,05$) oproti skupině T a S.

V játrech byl rovněž prokázán výrazně vyšší ($P < 0,05$) obsah EPA, DHA i sumy EPA + DHA ve skupinách s dietou F a dietou A oproti kontrolní skupině T a skupině S (Graf 4).

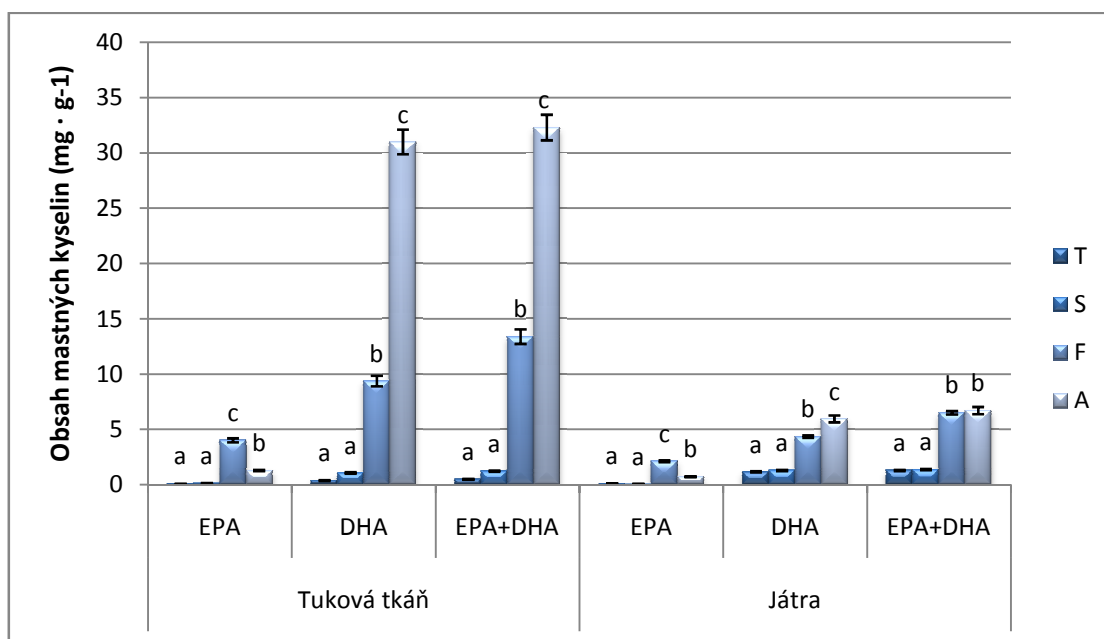
Zvýšené množství PUFA n-3 (hlavně EPA a DHA) v krmivu (F dieta, A dieta) tedy ovlivňuje žádoucí zvýšení hladiny těchto mastných kyselin v jaterní i tukové tkáni. Zvýšení obsahu EPA a DHA v dietě mělo vliv i na vzájemný poměr n-6 a n-3 PUFA, který se téměř přiblížil k optimální hodnotě, která je spojena se sníženým rizikem výskytu onemocnění srdce a cév, tedy i aterosklerózy.

Tab. 9: Obsah EPA a DHA v tukové tkáni a v játrech potkanů.

Dieta	Tuková tkáň (mg · g ⁻¹)			Játra (mg · g ⁻¹)		
	EPA	DHA	EPA+DHA	EPA	DHA	EPA+DHA
T	0,09 ± 0,005	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,04	0,13 ± 0,006	1,18 ± 0,05	1,31 ± 0,05
S	0,16 ± 0,006	1,08 ± 0,06	1,24 ± 0,06	0,08 ± 0,007	1,31 ± 0,05	1,39 ± 0,05
F	4,03 ± 0,18	9,39 ± 0,48	13,4 ± 0,66	2,15 ± 0,09	4,37 ± 0,1	6,52 ± 0,15
A	1,3 ± 0,06	31 ± 1,11	32,3 ± 1,16	0,74 ± 0,03	5,97 ± 0,31	6,72 ± 0,33

Pozn. - průměr ± střední chyba průměru

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy Schizochytrium



Graf 4: Obsah EPA a DHA v tukové tkáni a v játrech potkanů.

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy Schizochytrium

a, b, c – hodnoty označené různými písmeny se od sebe liší na hladině významnosti $P < 0,05$, měřeno pomocí jedноступňového třídění analýzy rozptylu (ANOVA) včetně zjištění kontrastů Tukeyovým testem.

5.4 Vyhodnocení relativní exprese genů

Hodnoty C_T (*threshold cycle*) cílových genů, které byly naměřeny metodou qPCR, byly normalizovány podle housekeepingového genu *ACTB*, který má vždy stejnou expresi za všech podmínek. Relativní změny v expresi testovaných genů u experimentálních skupin (S, F a A dieta) potkanů byly analyzovány ve vztahu k úrovni exprese genů u kontrolní (T) skupiny potkanů pomocí softwaru qbase+ (Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgie). Bylo tedy stanoveno procentuální zvýšení/snížení exprese genů experimentálních skupin oproti skupině kontrolní. Průměrné C_T hodnoty cílových genů u každé dietární skupiny jsou uvedeny v tab. 10.

V rámci projektu IGA byla testována jednak exprese genů kódujících důležité receptory kyselin EPA a DHA (geny *GPR120*, *ADIPOR1* a *ADIPOR2*), tak i exprese genu pro transkripční faktor $PPAR\gamma$. Cílem mé diplomové práce bylo vyhodnotit relativní expresi genů pro receptory (Grafy 5 a 6). $PPAR\gamma$ byl hodnocen v rámci jiné diplomové práce.

Tab. 10: Průměrné hodnoty C_T pro housekeepingový gen a cílové geny u jednotlivých pokusných skupin.

Skupiny	<i>ACTB</i>	<i>GPR120</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>
T	16,2 ± 0,18	32,3 ± 0,14	21,5 ± 0,06	18,7 ± 0,05
S	16,0 ± 0,17	31,7 ± 0,12	21,5 ± 0,07	19,0 ± 0,06
F	16,1 ± 0,18	32,3 ± 0,10	21,6 ± 0,10	19,1 ± 0,09
A	15,9 ± 0,15	32,1 ± 0,11	21,5 ± 0,05	19,0 ± 0,05

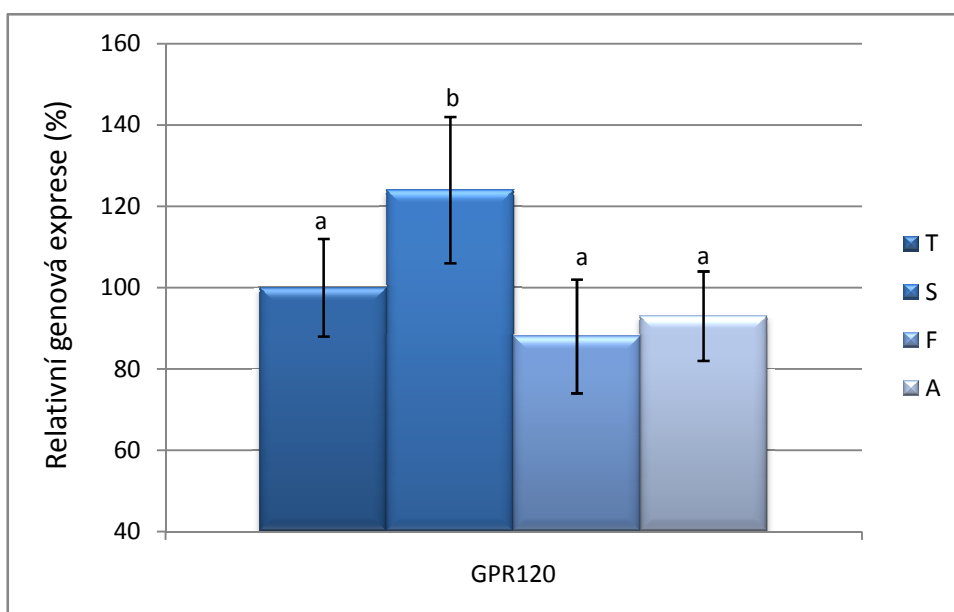
Pozn. - průměr ± střední chyba průměru

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy *Schizochytrium*

5.4.1 Relativní exprese genu *GPR120*

GPR120 je hlavním receptorem pro n-3 PUFA, hlavně pro EPA a DHA. Protizánětlivý účinek EPA a DHA zprostředkovaný právě přes *GPR120* je modulován vazbou těchto kyselin na *GPR120*, kdy dojde k aktivaci receptoru a následně k potlačení zánětu indukovaného imunitními buňkami - makrofágy.

Předpokládali jsme tedy, že zvýšená hladina EPA a DHA v jaterní tkáni rovněž povede ke zvýšené expresi genu kódujícího tento receptor. Výsledky relativní genové exprese genu pro receptor *GPR120* pro jednotlivé dietární skupiny jsou znázorněny v Grafu 5.



Graf 5: Relativní genová exprese genu *GPR120*

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); **S** - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; **F** - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); **A** - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy *Schizochytrium*

a, b – hodnoty označené různými písmeny se od sebe liší na hladině významnosti $P < 0,05$, měřeno pomocí jednostupňového třídění analýzy rozptylu (ANOVA) včetně zjištění kontrastů Tukeyovým testem

Relativní exprese pro gen *GPR120* byla u potkanů krmných směsí s přidavkem oleje ze světlice barvířské (S) 124 % kontroly ($P < 0,05$), u skupiny s přidavkem rybího oleje (F) byla relativní exprese 88 % kontroly ($P > 0,05$) a u skupiny s přidavkem oleje

z řasy *Schizochytrium* (A) byla relativní exprese rovněž snížena (neprůkazně) na 93 % ($P > 0,05$) oproti expresi tohoto genu v játrech u kontrolní skupiny (T).

Expresi genu *GPR120* byla zvýšená ($P < 0,05$) pouze u skupiny, které byl podáván olej ze světlice barvířské (S dieta). Expresi byla oproti kontrole (T; 100 %) zvýšená o 24 %. Naopak, ani dieta s rybím olejem (F; zdroj EPA), ani dieta s olejem z řasy *Schizochytrium* (A; zdroj DHA) průkazně nezvýšila ($P > 0,05$) expresi genu *GPR120* nad úroveň exprese u kontrolní skupiny. Naopak byla u těchto skupin exprese ještě nižší (byť neprůkazně; F o 12 %, A o 7 %). Výsledky tedy vyšly přesně naopak, než se předpokládalo.

V našem experimentu, který probíhal za *in vivo* podmínek, tedy nebyla exprese genu pro *GPR120* v jaterní tkáni potkanů ovlivněna vysokým příjmem EPA (F dieta) ani DHA (A dieta) ve srovnání s kontrolou. Zhodnocení přímého *in vivo* účinku dietárního rybího oleje nebo oleje z řasy *Schizochytrium* na úrovni exprese genu *GPR120* nelze nalézt ani v dostupné literatuře. Pouze Young Oh *et al.* (2010) ve své studii stimulovali *GPR120* pomocí n-3 PUFA. Skupině obézních potkanů a dále potkanům, u kterých byl gen pro *GPR120* cíleně knokautován, denně podávali suplementy s vysokým obsahem n-3 PUFA. U obézních potkanů došlo k utlumení zánětu, u knokautovaných potkanů nebyl pozorován žádný efekt. Vědci došli k závěru, že *GPR120* je funkční n-3 PUFA receptor, který působí protizánětlivě v *in vivo* podmínkách.

Jiné studie potvrzují, že aktivace *GPR120* po navázání n-3 PUFA má protizánětlivé účinky, ale pouze v podmínkách *in vitro*. Například Williams-Bey *et al.* (2014) zkoumali vliv DHA na potlačení produkce prozánětlivých cytokinů pomocí inhibice transkripčního faktoru NF- κ B na potkaních buněčných liniích. Tento jaderný faktor inhibovali právě aktivací *GPR120* po navázání DHA na tento receptor. Autoři došli k závěru, že aplikace vysokých dávek DHA utlumila zánět a snížila hladiny prozánětlivých cytokinů.

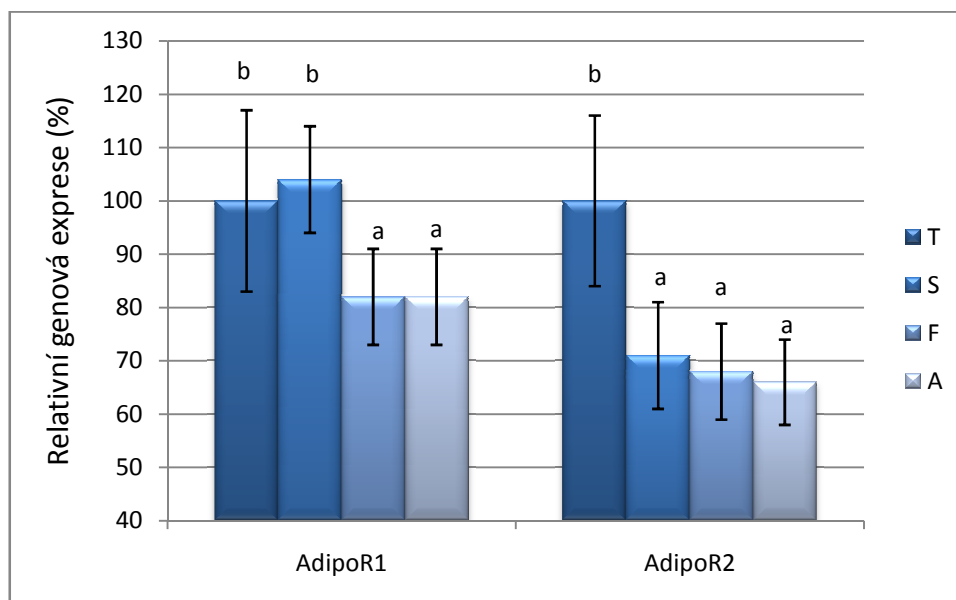
Liu *et al.* (2014) rovněž zkoumali protizánětlivé účinky DHA pomocí aktivace receptoru *GPR120* na myších makrofázích a lidských primárních makrofázích odvozených z monocytů. Potvrdili protizánětlivý vliv DHA, jelikož aplikací této mastné kyseliny došlo k aktivaci produkce prostaglandinu PGE2 s důsledkem inhibice signální dráhy jaderného faktoru NF- κ B a zároveň k inhibici sekrece prozánětlivého interleukinu IL-6.

Mobraten *et al.* (2013) zkoumali možné rozdíly v signální dráze receptoru GRP120 způsobené vlivem n-3 a n-6 PUFA ve střevních epitelálních buňkách (Caco-2 buňky). Rovněž došli k závěru, že EPA i DHA byly schopny inhibovat NF- κ B po vazbě na GPR120. Ke stejným výsledkům došli i Yan *et al.* (2013), kteří rovněž zkoumali protizánětlivý potenciál n-3 PUFA (hlavně EPA a DHA) přes aktivaci GPR120 pomocí stimulace prozánětlivých makrofágů.

5.4.2 Relativní exprese genů *ADIPOR1* a *ADIPOR2*

AdipoR1 a AdipoR2 jsou hlavními receptory pro klinicky významný hormon tukové tkáně - adiponektin, který má protizánětlivé účinky. AdipoR1 a AdipoR2 tedy nejsou přímými receptory pro EPA a DHA. Vliv těchto kyselin na hladinu adiponektinu je modulován pomocí aktivace transkripčního faktoru PPAR γ , jehož zvýšená exprese by měla rovněž zvyšovat expresi receptorů pro adiponektin.

Předpokladem tedy bylo, že zvýšená hladina EPA a DHA v jatrní i tukové tkáni u skupin F a A povede ke zvýšené expresi genů pro receptory AdipoR1 a AdipoR2. Výsledky relativní genové exprese genů pro receptory AdipoR1 a AdipoR2 u jednotlivých dietárních skupin jsou znázorněny v Grafu 6.



Graf 6: Relativní genová exprese genů *ADIPOR1* a *ADIPOR2*

T - kontrolní dieta (základní krmná směs s 20 % hověžího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály); *S* - základní krmná směs s 6 % světlicového oleje; *F* - základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris aselli); *A* - základní krmná směs s 6 % oleje z řasy *Schizochytrium*

a, b – hodnoty označené různými písmeny se od sebe liší na hladině významnosti $P < 0,05$, měřeno pomocí jedностupňového třídění analýzy rozptylu (ANOVA) včetně zjištění kontrastů Tukeyovým testem

Relativní exprese pro gen kódující AdipoR1 byla u potkanů krmených směsí s přidavkem oleje ze světlice barvířské (S) 104 % ($P > 0,05$), u skupiny s přidavkem rybího oleje (F) byla relativní exprese 82 % ($P < 0,05$) a u skupiny s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium* (A) byla relativní exprese rovněž 82 % ($P < 0,05$) vztaženo k expresi tohoto genu v játrech u kontrolní skupiny (T).

Relativní exprese pro gen kódující AdipoR2 byla u potkanů krmených směsí s přidavkem oleje ze světlice barvířské (S) 71 % ($P < 0,05$), u skupiny s přidavkem rybího oleje (F) byla relativní exprese 68 % ($P < 0,05$) a u skupiny s přidavkem oleje z řasy *Schizochytrium* (A) byla relativní exprese 66 % ($P < 0,05$) vztaženo k expresi tohoto genu v játrech u kontrolní skupiny (T).

Expresе genů kódujících receptory AdipoR1 a AdipoR2 v játrech se výrazně snížila ($P < 0,05$) v porovnání s kontrolot (T) jak u skupiny krmené rybím olejem (F dieta), tak i u skupiny, které byl podáván olej z řasy *Schizochytrium* (A dieta).

V rámci projektu IGA byly rovněž stanoveny hladiny hormonu adiponektinu ve viscerální tukové tkáni i v krevní plazmě metodou Western Blot a ELISA. Těmto metodám se podrobněji věnuje jiná diplomová práce (Bc. Petra Pešková), zde pro komplexnost předkládané práce uvádím pouze základní poznatky. Hladina adiponektinu se u skupin s dietou F a dietou A (vysoký obsah EPA a DHA) měla podle předpokladu zvýšit jak ve viscerální tukové tkáni, tak v krevní plazmě, což mělo rovněž vést i k vyšší relativní expresi genů pro AdipoR1 a AdipoR2. Výsledky relativní exprese však vyšly opačně (expresе se snížila), než se předpokládalo. Rovněž hladina adiponektinu v tukové tkáni měla tendenci se snižovat ($P > 0,05$) oproti kontrole. Naopak byl dle předpokladu zaznamenán výrazný ($P < 0,05$) nárůst adiponektinu v plazmě.

Výsledky týkající se vlivu EPA a DHA na hormon adiponektin, a tedy i na expresi genů pro AdipoR1 a AdipoR2 jsou v předkládané diplomové práci nejednoznačné, ale i přes to jsou v souladu s většinou dostupných literárních zdrojů. Například v experimentu autorů Lefils *et al.* (2010) rovněž neměla DHA vliv na množství hladiny adiponektinu v epidydimální tukové tkáni u myši, ale výrazně se zvýšila plazmatická koncentrace adiponektinu.

Moreno-Aliaga *et al.* (2010) ve své studii uvádějí, že po dlouhodobém působení kyseliny EPA (200 μM) na kulturu adipocytů *in vitro* došlo ke snížení genové exprese receptorů pro adiponektin.

Účinek EPA a DHA přijímaných v potravě na expresi genů pro receptory AdipoR1 a AdipoR2 u potkanů *in vivo* doposud nebyl popsán v dostupné literatuře. Nicméně, autoři Patel *et al.* (2012) došli k závěru, že vzhledem k obecně velmi vysoké koncentraci adiponektinu v plazmě potkanů (v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) je hladina tohoto hormonu pravděpodobně primárně řízena množstvím receptorů než samotnou koncentrací adiponektinu.

6 ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na vliv n-6 a hlavně n-3 polynenasycených mastných kyselin na expresi genů kódujících důležité membránové receptory GPR120, AdipoR1 a AdipoR2 na modelovém organismu laboratorního potkana. Byl zkoumán vliv těchto mastných kyselin, hlavně kyseliny eicosapentaenové (EPA) a kyseliny dokosahexaenové (DHA) na snižování rizika aterosklerózy, která byla podmíněna předpokládaným nízkým stupněm chronicky probíhajícího zánětu v organismu. Zánět byl u potkanů indukován vysokým příjmem aterogenní diety. Na molekulární úrovni je funkce EPA a DHA jako nutriceutik založena na modulaci signálních drah zprostředkovaných jaderným faktorem kappa B (NF- κ B), který hraje klíčovou roli v imunitní prozánětlivé odpovědi na podnět. Tyto signální dráhy mohou být v buňce modulovány právě přímou vazbou EPA a DHA na receptor GPR120 (stěžejní receptor vstupu EPA a DHA do buňky) nebo prostřednictvím vazby protizánětlivého a protiaterogenního hormonu adiponektinu na receptory AdipoR1 a AdipoR2, kdy EPA a DHA působí jako agonisté pro zvýšení aktivity adiponektinu.

Potkani, kteří byli vykrmeni až do stavu předpokládané mírné obezity, byli rozděleni do skupin podle typu diety. Následně se hodnotily rozdíly v jejich konečné hmotnosti mezi jednotlivými skupinami. Dle předpokladu byla u experimentálních skupin tendence ($P > 0,05$) ke snižování konečné hmotnosti oproti kontrole. U skupiny s dietou A byl pokles hmotnosti nejvýraznější ($P < 0,05$). DHA měla tedy na konečnou hmotnost potkanů nejlepší účinky.

Dílčím cílem této práce bylo stanovení hladiny glukózy v krevní plazmě (glykémie), kdy jsme předpokládali sníženou koncentraci glukózy u skupin s dietou S, F i A oproti kontrolní skupině T. Náš předpoklad byl potvrzen. Výrazně snížená byla glykémie u skupiny A ($P < 0,05$), u ostatních experimentálních skupin (S, F) byla pouze tendence ke snižování hladiny glukózy ($P > 0,05$). DHA je tedy nejúčinnější z použitých MK na snižování glykémie.

Dalším dílčím cílem bylo stanovení MK v tukové a jaterní tkáni, kdy jsme rovněž předpokládali zvýšený obsah EPA a DHA v těchto tkáních u skupin s dietou F a A. Náš předpoklad se opět potvrdil. Jak v tukové, tak i v jaterní tkáni byl obsah těchto MK výrazně vyšší ($P < 0,05$) u F i A oproti kontrolní skupině T i skupině S. Lepší výsledky vykazovala DHA oproti EPA, došlo tedy i k částečnému potvrzení hypotézy, že DHA je jako protizánětlivé nutriceutikum efektivnější než EPA.

Nejdůležitějším cílem této práce však bylo potvrdit či vyvrátit náš předpoklad, že u potkanů, kteří měli v dietě vysoký příjem kyselin EPA (rybí olej - F dieta) a DHA (olej z řasy *Schizochytrium* - A dieta), dojde ke zvýšení exprese genů pro receptory GPR120, AdipoR1 i AdipoR2 oproti kontrolní skupině potkanů, která byla po celou dobu experimentu krmena aterosenní dietou, respektive oproti skupině potkanů, kteří byli krmeni směsí s přidavkem světlicového oleje (zdroj n-6 mastných kyselin).

U genu *GPR120* nedošlo vlivem přidavku rybího oleje k průkaznému rozdílu v expresi, zaznamenali jsme pouze neprůkaznou tendenci, a to snížení na 88 % ($P > 0,05$). Vlivem přidavku oleje z řasy *Schizochytrium* byly výsledky podobné, tedy snížení exprese na 93 % ($P > 0,05$) oproti kontrolní skupině potkanů (100 %). Výsledky tedy byly v rozporu s naší hypotézou.

Rovněž oba geny kódující receptory pro adiponektin, *ADIPOR1* i *ADIPOR2* vykazovaly u skupin s přidavkem rybího oleje i oleje z řasy *Schizochytrium* výrazně sníženou relativní expresi ($P < 0,05$). U genu *ADIPOR1* to bylo 82 % pro skupinu s dietou F i dietou A oproti kontrolní skupině. U genu *ADIPOR2* to bylo 71 % u skupiny s dietou F a 68 % u skupiny s dietou A. Výsledky relativní exprese tedy opět vyšly opačně, než jsme předpokládali. V rámci projektu IGA byly zkoumány i koncentrace hormonu adiponektinu v tukové tkáni a krevní plazmě, kde se předpokládala vysoká koncentrace u F a A diety. Tato hypotéza se potvrdila pouze u krevní plazmy, kde koncentrace adiponektinu byla zvýšená ($P < 0,05$). Výsledky týkající se adiponektinu a exprese jeho receptorů v této diplomové práci a dalších paralelně předkládaných diplomových pracích jsou tedy nejednoznačné, ovšem v této nejednoznačnosti se přesně shodují s dostupnou literaturou: EPA a DHA zvyšují hladinu adiponektinu v plazmě, aniž by však ovlivňovaly množství adiponektinu v adipocytech.

Převážná většina dostupné literatury zabývající se touto tematikou byla prováděna za *in vitro* podmíněk, kde se protizánětlivý účinek EPA a DHA zkoumal přímo na konkrétních buněčných liniích. V našem experimentu jsme se snažili tyto vlivy zkoumat *in vivo*. Je to komplikovanější metoda, neboť účinek MK není cíleně směřován na konkrétní buňky a vlivy na organismus jsou zkoumány komplexně. Bylo by proto vhodné provést ještě další modifikované *in vivo* studie s touto problematikou, které by pomohly více porozumět protizánětlivým účinkům EPA a DHA na organismus. Jednou z možností jak navýšit účinky EPA/DHA by mohl být například i vyšší obsah těchto n-3 PUFA v krmivu.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J. Raff M., Roberts K., Walter P.** 2005. *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. *Espero*. 263-267 s. ISBN 80-902906-2-0
- Astarita G., Kendall A.C., Dennis E.A., Nicolaou A.** 2014. Targeted lipidomic strategies for oxygenated metabolite of polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 456-468 s. ISSN 1672-9145
- Becker J., Delayre-Orthez C., Frossard N., Pons F.** 2006. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 20: 2-15 s. ISSN 1472-8206
- Brocker C., Thompson D., Matsumoto A., Nebert D.W., Vasiliou V.** 2010. Evolutionary divergence and fiction of the human interleukin (IL) gene family. *Human Genomics*. 5: 30-55 s. ISSN 1479-7364
- Busso N., Karababa M., Nobile M., Rolaz A., Van Gool F., Galli M., Leo O., So A., DeSmedt T.** 2008. Pharmacological inhibition of nikotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS ONE*. 3: 2267-2271 s. ISSN 1932-6203
- Calder P.C.** 2009. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*. 91: 791-795 s. ISSN 0300-9084
- Calder P.C.** 2012. Long-chain fatty acids and inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*. 71: 284-289 s. ISSN 0029-6651
- Carling D., Sanders M.J., Woods A.** 2008. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *International Journal of Obesity*. 4: 55-59 s. ISSN 0307-0565
- Češka R.** 2012. Cholesterol a ateroskleróza, léčba dislipidemií. 2. vydání. *Triton*. 408 s. ISBN 978-80-7387-599-2
- Dangardt F., Osika W., Chen Y., Nilsson U., Gan L.M., Gronowitz E., Strandvik B., Friberg P.** 2010. Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular fiction and reduces inflammation in obese adolescents. *Atherosclerosis*. 212: 580-585 s. ISSN 0021-9150
- DiPatrizio N.V.** 2014. Is fat taste ready for primetime? *Physiology & Behavior*. 136: 145-154 s. ISSN 0031-9384

Drzymala-Cryz S., Banasiewicz T, Tubacka M., Tarasiuk-Rusek A., Majewski P., Drews M., Walkowiak J. 2012. Discrepancy between clinical and histological effects of DHA model of pouchitis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 50: 125-129 s. ISSN 1897-5631

Dudová S., Hájek R. 2008. Využití metody Real-time PCR vybraných genů u mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*. Aps Brno: Česká lékařská společnost J.E. Purkyně. 21: 227-229. ISSN 0862-495X

Elbekai R.H., El-Kadi A.O. 2006. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 112: 564-587 s. ISSN 0163-7258

Evans R.M., Barish G.D., Wang Y.X. 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Natural Medicine*. 10: 355-361 s. ISSN 1546-170X

Fakhrudin N., Waltenberger B., Cabaravdic M., Atanasov A.G., Malainer C., Schachner D., Heiss E.H., Liu R., Noha S.M., Grzywacz A.M., Mihaly-Bison J., Awad E.M., Schuster D., Breuss J.M., Rollinger J.M., Bochkov V., Stuppner H., Dirsch V.M. 2013. Identification of plumericin as a potent new scaffold inhibitor of the NF- κ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 171: 1676-1686 s. ISSN 1476-5381

Fang X., Sweeney G. 2006. Mechanisms regulating energy metabolism by adiponectin in obesity and diabetes. *Biochemicals Society Transactions*. 34: 798-801 s. ISSN 1470-8752

Feige J.N., Gelman L., Michalik L., Desvergne B., Wahli W. 2004. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Progress in Lipid Research*. 45: 120-159 s. ISSN 0163-7827

Ferenčík M. 2005, Imunitní systém: informace pro každého. Grada, Praha. 71-77 s. ISBN 978-80-247-6740-6

Ferrero-Miliani L., Nielsen O.H., Andersen P.S., Girardin S.E. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical & Experimental Immunology*. 147: 227-235 s. ISSN 1365-2249

Figueroa J.D., Cordero K., Baldeosingh K., Torrado A.I., Walker R.L., Miranda J.D., De Leon M. 2012. Docosahexaenoic Acid Pretreatment Confers Protection and Functional Improvements after Acute Spinal Cord Injury in Adult Rats. *Journal of Neurotrauma*. 29: 551-566 s. ISSN 1557-9042

Flock M.R., Harris W.S., Kris-Etherton P.M. 2013. Long-chain omega-3 fatty acids: time to establish a dietary reference intake. *Nutrition Reviews*. 71: 692-707 s. ISSN 1753-4887

Fraga D., Meulia T., Fenster S. 2008. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 1-40 s. ISBN 978-0-470-08993-4

Gilmore T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25: 6680-6684 s. ISSN 1476-5594

Graham B., Gibson S. B. 2005. The Two Faces of NFkB in Cell Survival Responses. *Cell Cycle*. 4: 1342-1345 s. ISSN 1551-4005

Haluzík M., Svačina Š. 2005. Metabolický syndrom a nukleární receptory PPAR. Grada Publishing, Praha. ISBN 978-80-247-6246-3

Hoffmann A., Natoli G., Ghosh G. 2006. Transcriptomal regulativ via the NFkB signaling module. *Oncogene*. 25: 6706-6716 s. ISSN 1476-5594

Holeček M. 2006. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. 1. vydání. Grada, Praha. ISBN 80-2471-5627

Hromadová D. 2004. Kardiovaskulární onemocnění. Neptun: Brno. 190 s. ISBN 80-902896-8-1

Huerta A.E., Prieto-Hontoria P.L., Fernández-Galilea M., Sáinz N., Cuervo M., Martínez J.A., Moreno-Aliaga M.J. 2015. Circulating irisin and glukose metabolism in overweight/obese women: Effects of A-Lipoic acid and eicosapentaenoic acid. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 1-13 s. ISSN 1877-8755

Hughes-Fulford M., Tjandrawinata R.R., Li C-F., Sayyah S. 2005. Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A₂ in prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 26: 1520-1526 s. ISSN 1460-2180

Ichimura A., Hirasawa A., Poulain-Godefroy O., Bonnefond A., Hara T., Yengo L. 2012. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 483: 350-354 s. ISSN 1476-4687

Innis S.M. 2008. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Research*. 1237: 35-43 s. ISSN 0006-8993

Issemann I., Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347: 645-50 s. ISSN 1476-4687

Jump D.B., Depner CH.M., Tripathy S. 2012. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *Journal of Lipid Research*. 53: 2525-2545 s. ISSN 1539-7262

Jump D.B., Tripathy S., Depner CH.M. 2013. Fatty Acid-Regulated Transcription Factors in the Liver. *Annual Review Nutrition*. 33: 249-269 s. ISSN 0199-9885

King R.C., Stansfield W.D., Mulligan P.K. 2006. A dictionary of Genetics, Seventh Edition. *Oxford University Press*. ISBN 978-1-4441-2859-8

Kluda P. 2003. Moderní analytické metody. 2. vydání. Ostrava. 132 s. ISBN 80-863-6907-2

Kohout P. 2010. Možnosti ovlivnění imunitního systému nutraceutiky. *Klinická farmakologie a farmacie*. 47-50 s. ISSN 1803-5353

Komprda T. 2003. Základy výživy člověka. 1. vydání. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno. 162 s. ISBN 978-80-7157-655-620072012

Komprda T. 2007. Základy výživy člověka. 2. vydání. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno. 164 s. ISBN 978-80-7157-655-6

Komprda T. 2009. Výživou ke zdraví. TeMi CZ, Velké Bílovice. 110 s. ISBN 978-80-87156-41-4

Komprda T. 2012. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals. *Journal of Functional Foods*. 4: 25-38 s. ISSN 1756-4646

Kostadinova R., Wahli W., Michalik L. 2005. PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 2413-2446 s. ISSN 1875-533X

Kozera B., Rapacz M. 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*. 54: 391-406 s. ISSN 2190-3883

Lee, S., Hong, J., Choi, S. Y., Oh, S. B., Park, K., Kim, J. S., Karin, M., Lee, S. J. 2004. CpG oligodeoxynucleotides induce expression of proinflammatory cytokines and chemokines in astrocytes: the role of c-Jun N-terminal kinase in CpG ODN-mediated NF- κ B activation. *Journal of Neuroimmunology*. 153: 50-63 s. ISSN 0165-5728

Lefils J., Geloën A., Vidal H., Lagarde M., Bernoud-Hubac N. 2010. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *British Journal of Nutrition*. 104: 1304-1312 s. ISSN 0007-1145

Lindqvist H.M., Sandberg A.S., Fagerberg B., Hulthe J. 2009. Plasma phospholipid EPA and DHA in relation to atherosclerosis in 61-year-old men. *Atherosclerosis*. 205:574-578 s. ISSN 0021-9150

Linq P.R., Malkan A., Le H.D., Puder M., Bistrrian B.R. 2012. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid supplemented to an Essentials fatty acid-deficient diet alters the response to endotoxin in rats. *Metabolism*. 61: 395-406 s. ISSN 0026-0495

Liu Y., Chen L.Y., Sokolowska M., Eberlein M., Alsaaty S., Martinez-Anton A., Logun C., Qi H.-Y., Shelhamer J.H. 2014. The fish oil ingredient, docosahexaenoic acid, activates cytosolic phospholipase A₂ via GPR120 receptor to produce prostaglandin E₂ and plays an anti-inflammatory role in macrophages. *Immunology*. 143:81-95 s. ISSN 1365-2567

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDeltaC(T)) Method. *Methods*. 25:402-408 s. ISSN 1046-2023

Majdalawieh A., Ro H.S. 2010. PPAR γ 1 and LXR α face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1. *Nuclear Receptor Signaling*. 8: 3-17 s. ISSN 1550-7629

Marchioli R. 2002. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids After Myocardial infarction. Time-course analysis of the results of the gruppo italiano per lo studio della sopravvivenza nell'infarto miocardico. *Circulation*. 105: 1897-1903 s. ISSN 1524-4539

Martinez-Rubio L., Morais S., Evensen Q., Wadsworth S., Vecino J.G., Ruohonen K., Bell J.G., Tocher D.R. 2013. Effect of functional feeds on fatty acid and eicosanoid metabolism in liver and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with experimentally induced Heart and Skeletal Muscle Inflammation. *Fish & Shellfish Immunology*. 34: 1533-1545 s. ISSN 1050-4648

Matouš B., Bubnová B., Buděšínská A., Černý R., Kazda A., Kleibl Z., Kotyza J., Křemen J., Kvasnička J., Pelouch V., Štípek S., Zima T. 2010. Základy lékařské chemie a biochemie. 1. vydání. Galén, Praha. ISBN 978-80-7262-702-8

Michalik L., Auwerx J., Berger J.P., Chatterjee V.K., Class Ch.K., Gonzalez F.J., Grimaldi P.A., Kadowaki T., Lazar M.A., O'rahilly S., Palmer C.N.A., Plutzky J., Reddy J.K., Spiegelman B.M., Staels B., Wahli W. 2006. International Union

of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacological Reviews*. 58: 726-741 s. ISSN 1521-0081

Mobraten K., Haug T.M., Kleiveland C.R., Lea T. 2013. Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids in Health and Disease*. 12: 2-7 s. ISSN 1476-511X

Moreno-Aliaga M.J., Lorente-Cebrian S., Martinez, J.A. 2010. Fatty acids and the immune system. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society*. 69: 324-332 s. ISSN 0029-6651

Mourek J. 2007. Mastné kyseliny omega-3 – zdraví a vývoj. Triton, Praha. 175 s. ISBN 978-80-7254-917-7

Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. 2002. Harperova biochemie. 4. vydání. H+H. Praha. 148 – 152 s. ISBN 80-7319-013-3

Nakamura M.T., Nara T.Y. 2004. Structure, function and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annual Review of Nutrition*. 24: 345-376 s. ISSN 0199-9885

Novák F. 2002. Úvod do klinické biochemie. 1. vydání. Karolinum. Praha. 341 s. ISBN 80-246-0366-7

Novotný D., Vaverková H., Karásek H., Halenka M. 2008. Adiponektin – parametr s protizánětlivým a proti aterosklerotickým potenciálem. *Klinická Biochemie Metabolismu*. 16: 171-177 s. ISSN 1210-7921

Ostermann A.I., Müller M., Willenberg I., Schebb N.H. 2014. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography – a comparison of different derivatization and extraction procedures. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 91: 235-241 s. ISSN 0952-3278

Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., Walsh K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Immunology*. 11: 85-97 s. ISSN 1365-2567

Pahl H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 18: 6853-6866 s. ISSN 1476-5594

Park B.H., Vogelstein B., Kinzler K.W. 2001. Genetic disruption of PPARdelta decrease the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 98: 2598-2603 s. ISSN 1091-6490

Patel S.A., Hoehn K.L., Lawrence R.T., Sawbridge L., Talbot N.A., Tomsig J.L., Turner N., Cooney G.J., Whitehead J.P., Kraegen E.W., Cleasby M.E. 2012. Overexpression of the adiponectin receptor AdipoR1 in rat skeletal muscle amplifies local insulin sensitivity. *Endocrinology*. 153: 5231-5246 s. ISSN 0013-7227

Rogue A., Spire C., Brun M., Claude N., Guillouzo A. 2010. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. *PPAR research*. 1-16 s. ISSN 1687-4757

Rubin R., Strayer D.S., Rubin E. 2011. Rubin's pathology: Foundations of Medicine. 2: 37-71 s. ISBN 978-0-7817-9516-6

Sakai S., Iizuka N., Fujiwara M., Miyoshi M., Aoyama M., Maeshige N., Hamada Y., Usami Y., Usami M. 2013. Mild obesity reduces survival and adiponectin sensitivity in endotoxemic rats. *Journal of Surgical Research*. 185: 353-363 s. ISSN 0022-4804

Samková E., Pešek M., Špička J. 2008. Mastné kyseliny mléčného tuku skotu a faktory jejich zastoupení: Vědecká monografie. České Budějovice. 9-12 s. ISBN 978-80-7394-104-8

Sampath H., Ntambi J.M. 2006. Regulation of gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Heart and Metabolism*. 32: 32-35 s. ISSN 1566-0338

Sen, R., Baltimore, D. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 46: 705-716 s. ISSN 0092-8674

Shimada K., Miyazaki T., Hiroyuki D. 2004. Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clinical Chimica Acta*. 344: 1-12 s. ISSN 0009-8981

Scheffe J.H., Lehmann K.F., Buschmann I.R., Unger T., Funke-Kaiser H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel „gene expression's C_T difference“ formula. *Journal of Molecular Medicine*. 84: 901-910 s. ISSN 1432-1440

Simopoulos A. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 233: 674-688 s. ISSN 1535-3699

Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M. 2000. CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*. 69: 145-82 s. ISSN 0066-4154

Snustad D.P., Simmons M.J. 2009. Genetika. *Masarykova Univerzita, Brno*. 6 s. ISBN 9788021048522

Soumia P., Sandeep Ch., Jubbin J.J. 2013. A fis a day, keks the cardiologist away! – A review of the effect of omega-3 fatty acids in the cardiovascular systém. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 17: 422-429 s. ISSN 2230-9500

Starley J.C. 2007. The effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *British Journal of Nutrition*. 98: 1305-1310 s. ISSN 1475-2662

Stillwell W., Wassall S.R. 2003. Docosaehaenoic acid: membráně properties of a Unixe fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids*. 126: 1-27 s. ISSN 0009-3084

Svačina Š., Bretšnajderová M., Holcátová I., Horáček J., Kovářová K., Kreuzbergová J., Müllerová D., Peiskerová M., Ryšavý Z., Sulková S., Šmahelová A. 2008. *Klinická dietologie*. Grada publishing a. s., Praha. 384 s. ISBN 978-80-247-2256-6

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

Tsuchida A., Yamauchi T., Takekawa S. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)α activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue. *Diabetes*. 54: 3358–3370 s. ISSN 1939-327X

Velíšek J. 1999. *Chemie potravin 1*. OSSIS, Tábor. 352 s. ISBN 80-902391-4-7

Williams-Bey Y., Boularan C., Vural A.; Huang N.N., Hwang I.Y., Snan-Shi C., Kehrl J.H. 2014. Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF-κB activation and enhancing autophagy. *PLoS ONE*. 9. ISSN 1932-6203

Wu A., Ying Z., Gomez-Pinilla F. 2014. Exercise facilitates the action od dietary DHA on functional recovery after brain trauma. *Neuroscience*. 248: 655-663 s. ISSN 0306-4522

Yamamoto Y., Gaynor R. B. 2001. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Current Molecular Medicine*. 1: 287-296 s. ISSN 1875-5666

Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Hara K., Tsunoda M., Murakami K. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 423: 762-769 s. ISSN 1476-4687

Yan Y., Jiang W., Spinetti T., Tardivel A., Castillo R., Bourquin C., Guarda G., Tian Z., Tschopp J., Zhou R. 2013. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Cell*. 6: 1154-1163 s. ISSN 0092-8674

Young Oh D., Talukdar S., Bae E.J., Imamura T., Morinaga H., Fan W., Li P., LuW.J., Watkins S.M., Olefsky J.M. 2010. GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects. *Cell*. 142: 687-698 s. ISSN 0092-8674

Internetové zdroje:

Entrez gene 1: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 15. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338557> >

Entrez gene 2: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 15. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/294075> >

Entrez gene 3: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 15. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9370> >

Entrez gene 4: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 15. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/246253> >

Entrez gene 5: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 15. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51094> >

Entrez gene 6: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 15. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/289036> >

Entrez gene 7: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 16. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79602> >

Entrez gene 8: NCBI - The National Center for Biotechnology Information [online]; [cit. 16. 4. 2015] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/312670> >

Generi Biotech: GENERI BIOTECH s.r.o. [online]; [cit. 17. 4. 2015] < www.gyn-test.cz/metody-provadeni-testu >

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	základní krmná směs s 6 % oleje z řasy <i>Schizochytrium microalga</i>
AA	<i>arachidonic acid</i> – kyselina arachidonová
AdipoR1	<i>adiponectin receptor 1</i> – receptor pro adiponektin 1
AdipoR2	<i>adiponectin receptor 2</i> – receptor pro adiponektin 2
ALA	<i>alpha-linoleic acid</i> – kyselina α -linolová
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i> – kyselina dokosahexaenová
EPA	<i>eicosapentaenoic acid</i> – kyselina eikosapentaenová
F	F dieta, základní krmná směs s 6 % rybího tuku (komerční oleum jecoris asseli)
GPR120	<i>G protein-coupled receptor 120</i> – receptor spřezžený s G proteinem 120
LA	<i>linoleic acid</i> – kyselina linolová
LT	leukotrien
MK	mastné kyseliny
MUFA	<i>monounsaturated fatty acids</i> – mononenasyčené mastné kyseliny
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> – jaderný faktor kappa B
PG	prostaglandin
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> – receptory aktivované proliferátory peroxizomů
PPARγ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> – receptory aktivované proliferátory peroxizomů gama
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i> – polynenasycené mastné kyseliny
S	S dieta, základní krmná směs se 6 % světlicového oleje
SCO	srdečně cévní (kardiovaskulární) onemocnění
T	kontrolní dieta – základní krmná směs s 20 % hovězího loje + 40 % kondenzovaného slazeného mléka + 2 % premixu - vitamíny/minerály
TF	<i>transcription factor</i> – transkripční faktor
TX	tromboxan