



**Vliv eikosapentaénové a dokosahexaénové kyseliny
na expresi vybraných genů podílejících se na modulaci
zánětlivé reakce u modelového organismu**

Diplomová práce

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

Vypracovala:
Bc. Markéta Charousová



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Markéta Charousová**
Studijní program: Zootecnika
Obor: Živočišné biotechnologie
Konzultant: MVDr. Petra Ondráčková, PhD., VÚVeL Brno
Název tématu: **Vliv eikosapentaénové a dokosahexaénové kyseliny na expresi vybraných genů podílejících se na modulaci zánětlivé reakce u modelového organismu.**
Rozsah práce: 50 stran

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na téma vlivu kyseliny eikosapentaénové a dokosahexaénové na buněčné signální dráhy související s modulací zánětu v savčím organismu.
2. Podrobněji se zaměřte na signální dráhy vedené přes transkripční faktor PPARgamma a receptor GPR120.
3. Seznamte se s laboratorními postupy izolace RNA z tkání, reverzní transkripce a kvantitativní PCR.
4. Podílejte se na odběru vzorků příslušných tkání prasat a na kvantifikaci expresí vybraných genů metodou q-RT-PCR.
5. Naměřené hodnoty vyhodnoťte relevantními statistickými metodami a dále zpracujte formou diplomové práce.

Seznam odborné literatury:

1. Clark, D.P. – Pazdemik, N.J.: Biotechnology; Elsevier, 2012, 715 pp.
2. Komprda, T.: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. Journal of Functional Foods 4, 2012, 25-38.
3. Komprda, T. et al.: Effect of dietary Schizochytrium microalga oil on selected markers of low-grade inflammation in rats. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 100, 2016, in print.
4. Liu, Y. et al.: 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, 2014, 81-95.
5. Pevsner, J.: Bioinformatics and Functional Genomics, 2nd Edition; Wiley-Blackwell, 2009, 951 pp.
6. Sambrook, J. – Russel, D.W.: Molecular Cloning, Volume 1 – 3, 3rd Edition, New York, 2001

Datum zadání diplomové práce: říjen 2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2017



Bc. Markéta Charousová

Autorka práce

Charousová

Komprda
prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

Vedoucí práce

Jarošová
prof. Ing. Alžběta Jarošová, Ph.D.

Vedoucí ústavu

Ryant
doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.

Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci na téma „Vliv eikosapentaénové a dokosahexaénové kyseliny na expresi vybraných genů podílejících se na modulaci zánětlivé reakce u modelového organismu“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon 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

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce prof. MVDr. Ing. Tomáši Komprdovi, CSc. za velkou pomoc při zpracování diplomové práce, cenné rady, teoretické i praktické znalosti. Také bych chtěla poděkovat Ing. Ondřeji Škultétymu za pomoc a podporu.

Dále děkuji Interní grantové agentuře Mendelovy univerzity v Brně za poskytnutí finančních prostředků pro projekt TP5/2015 Kyselina eikosapentaénová a dokosaheptaénová jako nutriceutika modulující zánětlivou reakci a homeostázu cholesterolu.

ABSTRAKT

V diplomová práce nesoucí název *Vliv eikosapentaénové a dokosahexaénové kyseliny na expresi vybraných genů podílejících se na modulaci zánětlivé reakce u modelového organismu* jsem vyhodnotila rozdíly v expresích genů *GPR120*, *PPAR γ* , *LBP*, *ICAM* a cytokinů *Il-4*, *Il-10*, *Il-1 β* a *TGF- β* . Jako modelový organismus bylo zvoleno prase. Prasata byla rozdělena do dvou skupin, kontrolní skupina byla krmena základním vyváženým krmivem s 2,5% přídatkem palmového oleje (P), druhé skupině bylo do krmiva přidáno 2,5% rybího oleje. Po výkrmu trvajícím 70 dní, byla půlka z každé skupiny stimulována LPS (P+ a R+). Z odebraných tkání (játra a tuk) byla izolována mRNA (Rneasa Mini Kit) následovala zpětná transkripce a vyhodnocení exprese kvantitativní RT-PCR. Téměř u všech genů došlo k nárůstu exprese po stimulaci LPS a to jak u skupiny P+ tak R+. Exprese mezi skupinami P- a R- se lišila minimálně nebo ve prospěch R-. Exprese R+ byla vždy větší než exprese R-. Naše hypotéza, že by EPA a DHA měla snižovat expresi genů při zánětu nebyla prokázána. Doporučuji proto provést další studie se stejným modelovým organismem k doplnění výsledků.

Klíčová slova: EPA, DHA, zánět, GPR120, PPAR γ , cytokiny.

ABSTRACT

In my study thesis *Effect of eikosapentaenoic and dokosaheptaenoic acids on expression of selected genes, which participate in modulation of inflammatory reaction at model organism* I evaluated expression of genes *GPR120*, *PPAR γ* , *LBP*, *ICAM*, *Il-4*, *Il-10*, *Il-1 β* and *TGF- β* . As model organism was selected pig. The pigs were divided in two groups, the control group was fed with 2,5% addition of palmitic oil (P), the second group was fed with 2,5% addition of fish oil. After 70 days long fattening was each group divided into halves. One half of each group was stimulated LPS (P+ and R+). Liver and adipose tissue were collected, mRNA was isolated (Rneasa Mini Kit), after reverse transcription the expression was measured by quantitative RT-PCR. By almost every genes there was increase in expression after LPS stimulation in groups P+ and R+. between P- and R- the expression was same or a little bit higher in R-. R+ was allways bigger than R-. The hypothesis were that EPA and DHA should reduce expression in inflammation. This hypothesis was not proofed. I recomend further studies with the same model organism to refill the results.

Keywords: EPA, DHA, inflammation, GPR120, PPAR γ , cytokines.

Obsah

Obsah	8
1 ÚVOD	10
2 CÍL PRÁCE	11
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1 Lipidy a jejich klasifikace	12
3.2 Mastné kyseliny	13
3.2.1 Nasycené mastné kyseliny (SFA)	14
3.2.2 MUFA	16
3.2.3 PUFA	16
3.3 Zánět	20
3.4 Cytokiny	21
3.5 Genová exprese	23
3.5.1 Rodina PPAR	24
3.5.2 GPR120	27
3.5.3 Housekeepingový gen TBP1	27
3.6 Izolace RNA	28
3.7 RT-PCR a kvantitativní PCR	29
4 METODIKA	31
4.1 Ustájení a výkrm prasat	31
4.2 Aplikace LPS a odběr vzorků	32
4.2.1 Stimulace LPS	32
4.2.2 Odběr vzorků	33
4.3 Kvantifikace genové exprese	33
4.4 Analýza mastných kyselin	35

4.5	Statistické vyhodnocení	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	Přírůstky hmotnosti	36
5.2	Genová exprese	36
5.2.1	GPR 120	36
5.2.2	PPAR γ	39
5.2.3	LBP	41
5.2.4	ICAM 1	44
5.2.5	IL-1 β	47
5.2.6	IL-4	50
5.2.7	IL-10	52
5.2.8	TGF- β 1	54
6	ZÁVĚR	56
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK	67

1 ÚVOD

Lipidy a mastné kyseliny jsou důležitou součástí potravy člověka i zvířat. Je prokázáno, že špatné zastoupení polynenasycených n-3 a n-6 mastných kyselin vede ke vzniku mnoha civilizačních chorob, např. obezity, kardiovaskulárních a cévních onemocnění či rakoviny. V dnešní době konzumujeme větší množství n-6 PUFA než n-3, mezi které patří i EPA a DHA. U nich víme, že pozitivně působí a léčí počínající zánět v organismu. Výborný přírodní zdroj PUFA n-3 mastných kyselin jsou například mořské ryby a další mořští živočichové. Doporučený příjem EPA a DHA je potom u dospělého člověka alespoň 2g až 3g na den.

Přesný mechanismus působení EPA a DHA v živočišném organismu není ještě zcela přesně popsán. Vzniká však velké množství různých studií, které se touto problematikou zabývají. Většina studií však pozoruje vliv těchto kyselin na buněčných liniích nebo na modelovém organismu: na myších. V této diplomové práci jsme měli jako modelový organismus většího a člověku bližšího živočicha - prase.

Na prasatech jsme sledovali vliv polynenasycených mastných kyselin EPA a DHA na expresi vybraných genů. Hypotéza na začátku práce byla, že u prasat, které budou krmeny rybím olejem, dojde ke snížení exprese daných genů oproti prasatům, které tímto olejem krmeny nebudou.

2 CÍL PRÁCE

- Nastudovat dostupnou literaturu k danému tématu: vliv polynenasycených mastných kyselin na modulaci zánětu, vlivy transkripčních faktorů na expresi vybraných genů.
- Prostudovat princip izolace mRNA, reverzní transkripce a kvantitativní PCR.
- Získané C_T vyhodnotit dostupnými statistickými metodami a vše zpracovat formou diplomové práce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Lipidy a jejich klasifikace

Lipidy jsou přírodní látky rostlinného i živočišného původu, vyskytující se v kapalném i pevném skupenství. Jejich označení pochází z řeckého slova *lipos*, tedy tučný. Chemicky se jedná o estery vyšších mastných kyselin a spolu se sacharidy a proteiny patří mezi základní složky ve výživě člověka i zvířat (Holeček, 2006). Jde o velmi heterogenní skupinu, povahou se může jednat o tuky, vosky, oleje a další příbuzné sloučeniny. Jejich společným znakem je částečná nebo úplná nerozpustnost ve vodě a naopak dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech, jako je ether, chloroform a benzen (Murray *et al.*, 2002). Lipidy jsou energeticky bohaté sloučeniny, jejich energetická denzita je 9,3kcal na 1 g tuku, to je o polovinu více než u sacharidů nebo proteinů (Matouš, 2010). Lipidy proto často slouží v organismu jako zdroj a zásobárna energie. Lipidy mají řadu dalších funkcí - ve formě fosfolipidů se podílí jako základní stavební složka na výstavbu buněčných membrán, dále chrání vnitřní orgány proti mechanickému poškození a podílejí se na termoregulaci. Mají také velký vliv na zdraví a výživu člověka, jsou důležitou složkou potravy jak pro svou energetickou významnost, tak pro obsah esenciálních mastných kyselin i pro příjem vitamínů rozpustných v tucích (A, E, D, K), které jsou zastoupeny v lipidové složce potravy (Murray *et al.*, 2002). Správné složení přijímaného tuku může mít i pozitivní vliv na prevenci různých onemocnění, nejčastěji kardiovaskulárních.

Nejčastěji dělíme lipidy dle Bloora:

1. Jednoduché lipidy – jde o estery mastných kyselin s různými alkoholy a podle struktury alkoholu je dále dělíme na tuky (estery mastných kyselin a glycerolu) a vosky (estery mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy).
2. Složené lipidy – jde o estery mastných kyselin s alkoholy a dalšími kovalentně vázanými skupinami. Ty dále dělíme na fosfolipidy, obsahující k MK a alkoholu zbytek kyseliny fosforečné, glykolipidy obsahující mastnou kyselinu, sacharidovou složku a sfingosin a ostatní složené lipidy, kam řadíme například lipoproteiny.

3. Prekurzory a odvozené lipidy – sem řadíme například glycerol, steroidy, mastné kyseliny a v tucích rozpustné vitamíny a hormony. Převzato z Murray *et al.* (2002).

3.2 Mastné kyseliny

Chemicky jde o karboxylové kyseliny s alifatickým uhlíkovým řetězcem, který je většinou složen ze sudého počtu atomů uhlíku od 4 do 26. V přírodě se mohou mastné kyseliny (MK) vyskytovat vázané v přírodních tucích a olejích nebo volně v tzv. neesterifikované formě (Holeček, 2006). Mastné kyseliny jsou důležitou součástí buněčných membrán, vyskytují se tam jak vázané ve formě fosfolipidů (tzv. esterifikované MK) i jako volné molekuly. V obou případech mají vliv na fyzikální i biologické vlastnosti membrán včetně organizace, elasticity nebo iontové propustnosti (Gorjão *et al.*, 2009).

Mastné kyseliny je možné dělit podle vícero kritérií. Podle délky je dělíme:

1. MK s krátkým řetězcem – méně než 6 atomů uhlíku
2. MK se středně dlouhým řetězcem – 6 až 12 atomů uhlíku
3. MK s dlouhým řetězcem – 12 až 20 atomů uhlíku
4. MK s velmi dlouhým řetězcem – nad 20 atomů uhlíku

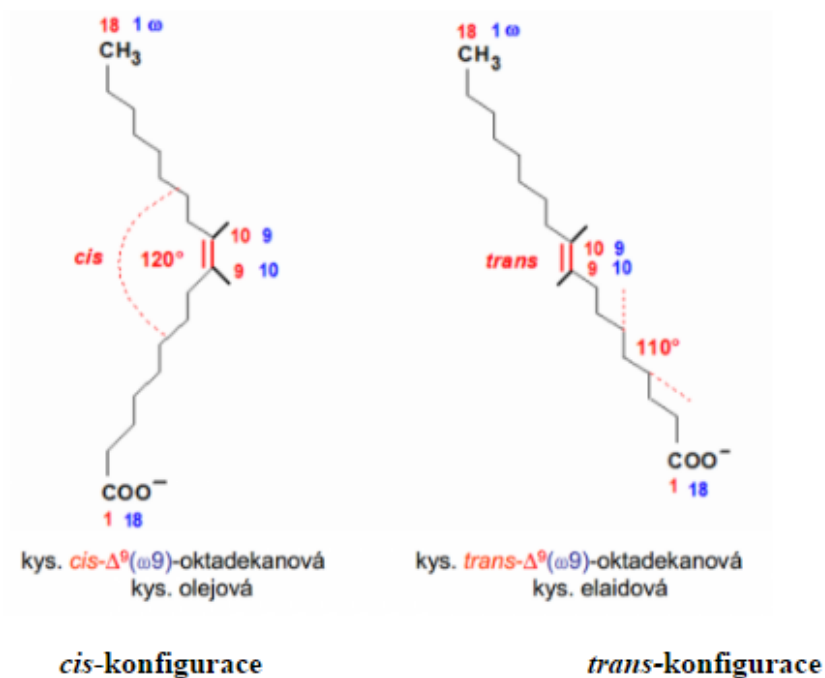
Další možností rozdělení je podle povahy řetězce:

1. Nasycené MK (SFA = Saturated fatty acid) – neobsahují žádnou dvojnou vazbu.
2. Nenasycené MK – obsahují alespoň jednu dvojnou vazbu ve svém řetězci. Dále dělíme nenasycené MK dvěma způsoby, dle počtu dvojných vazeb:
 - a. Mononenasycené (MUFA = Monounsaturated fatty acid)
 - b. Polynenasycené (PUFA = Polyunsaturated fatty acid)

podle geometrické izomerie (Obr. 1):

- a. *Cis* – oba části řetězce jsou umístěny ve stejné rovině dvojně vazby, ohnutí do tvaru L, v místě ohybu je svírán úhel 120° . Tuto konformaci najdeme u přirozeně se vyskytujících mastných kyseliny (Murray *et al.*, 2002)

- b. *Trans* – části řetězce směřují do různých rovin od dvojné vazby. Vykytují se hlavně v mikroorganismech, u přežvýkavců a můžeme je najít i v některých semenech (Holeček, 2006).



Obr. 1 Cis a trans konfigurace MK.
Zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/

3.2.1 Nasycené mastné kyseliny (SFA)

Nachází se v živočišných i rostlinných tucích, bohatý zdroj SFA je máslo, sádlo a oleje z tropických rostlin jako je kokosový a palmový olej (Grundy, 2013, Grofová, 2007). Slouží jako zdroj energie a jsou součástí buněčných membrán. Mají ovšem negativní vliv na zdraví, protože zvyšují hladinu cholesterolu v krvi (Grundy, 2013).

Tab. 1 Přehled nasycených MK. Upraveno z Kraml, 2008

http://che1.lf1.cuni.cz/html/Mastne_kyseliny_2sm.pdf, <http://www.pufa.cz>, Grundy, 2013

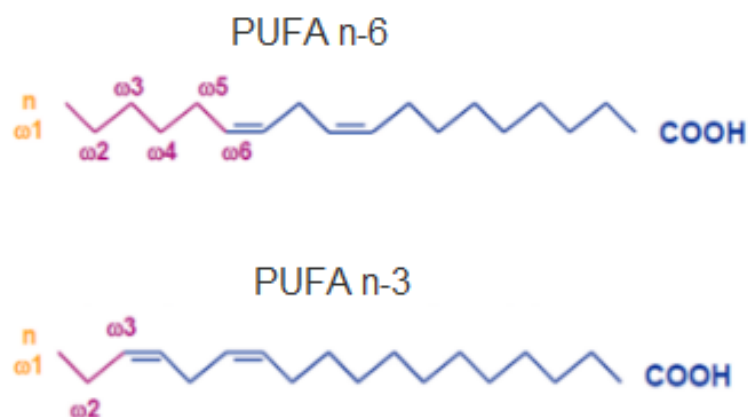
Triviální název	Systematický název	Počet uhlíků	Výskyt
Kys. octová	Ethanová k.	C2	Produkt trávení člověka a přežvýkavců
Kys. propiónová	Propanová k.	C3	Produkt trávení člověka a přežvýkavců
Kys. máselná			přežvýkavců, přítomna v másle a dalších tucích
Kys. kapronová	Hexanová k.	C6	Produkt trávení přežvýkavců, přítomna v másle a dalších tucích
Kys. kaprylová	Oktanová k.	C8	V tucích rostlinného původu
Kys. kaprinová	Dekanová k.	C10	V tucích rostlinného původu
Kys. laurová	Dodekanová k.	C12	Palmojadrový a kokosový olej
Kys. myristová	Tetradekanová k.	C14	Muškatový oříšek
Kys. palmitová	Hexadekanová k.	C16	Palmový olej, máslo, sýr, maso
Kys. stearová	Octadekanová k.	C18	Živočišné i rostlinné tuky
Kys. arachová	Eikosanová k.	C20	Řepkový olej, řepkový olej, kávový tuk
Kys. behenová	Dokosanová k.	C22	Součást tuků, rybího oleje, hořčičného oleje
Kys. lignocerinová	Tetrakosanová k.	C24	Řepkový olej
Kys. cerotová	Hexakosanová k.	C26	Včelí vosk

3.2.2 MUFA

Mononenasyčené mastné kyseliny mají dvojnou vazbu vycházející ze sedmého nebo devátého uhlíku v řetězci. Jsou odvozené z kyseliny olejové, bohatým zdrojem je olivový olej, avokádo a ořechy. Člověk spolu se zvířaty si je umí sám syntetizovat. Některé MUFA snižují hladinu LDL-cholesterolu (Svačina *et al.*, 2008), který se ukládá mimo jiné do stěn cév a může vyvolat závažná kardiovaskulární onemocnění. Naopak zvyšují hladinu HDL-cholesterolu, který tělu prospívá. Ten snižuje riziko srdečních onemocnění a zánětlivých onemocnění jako ateroskleróza.

3.2.3 PUFA

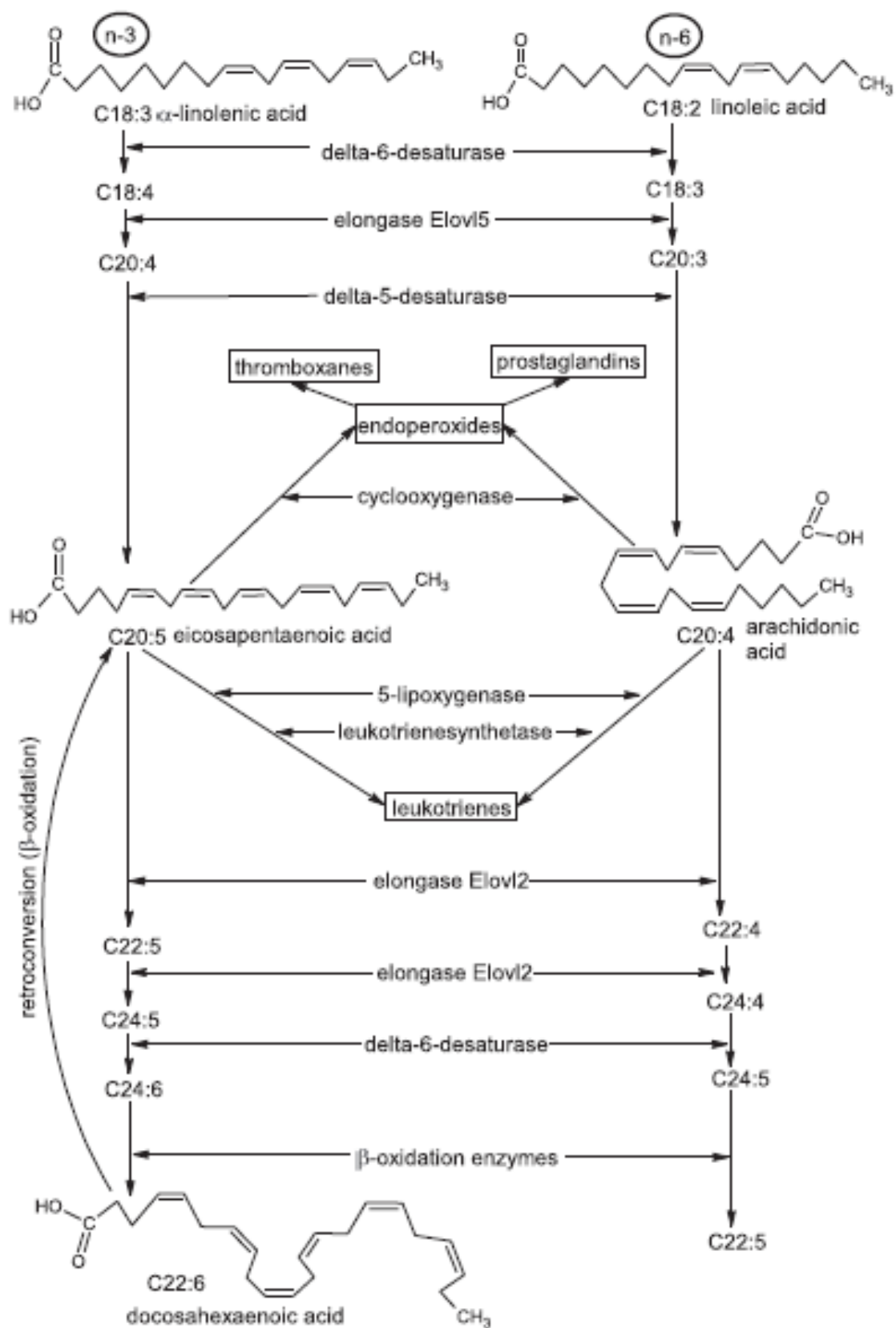
Jsou dvě kategorie polynenasycených mastných kyselin: n-6 a n-3, jejich rozdíl je v pořadí uhlíku (počítáno od metylového konce), ze kterého vychází první dvojná vazba (Obr. 2). PUFA MK jsou tzv. esenciální, protože si je savci nedokáží sami syntetizovat, a musí je proto přijímat v potravě. Zástupce omega-6 mastných kyselin je kyselina linolová (LA), tu najdeme nejčastěji ve velkém množství rostlinných olejů (kukuřičný olej, slunečnicový olej nebo olej ze sójových bobů). Zástupce omega-3 MK je potom kyselina α -linolenová (ALA), ta se nachází v chloroplastech zelených listů zeleniny (Simopoulos, 1991). Mezi další významné zástupce PUFA-3 patří kyselina eikosapentaénová (EPA) a kyselina dokosaheptaénová (DHA), ty redukuje množství VLDL a ovlivňují expresi LDL ve stěnách artérií (Grundy, 2013).



Obr. 2 Přehled rozdělení MK podle polohy první dvojně vazby.
Upraveno z http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/

Savčí buňky nedokáží konvertovat omega-6 MK na omega-3 MK, protože postrádají potřebný enzym omega-3 desaturázu. LA a ALA a jejich deriváty jsou důležitou součástí živočišných i rostlinných buněčných membrán. Tyto dvě esenciální mastné kyseliny jsou metabolicky i funkčně odlišné a často mají protichůdné fyziologické účinky. Správný balanc mezi nimi je důležité pro dobré zdraví. Při konzumaci rybího oleje EPA a DHA nahradí omega-6 MK v membránách buněk, hlavně AA (kys. arachnidová). AA a EPA jsou hlavní výchozí složkou pro vznik eikosanoidů. V závislosti na západní dietě, která se bohatá na omega-6 MK se vytváří eikosanoidy hlavně z kyseliny AA a následně další metabolické produkty jako prostaglandiny, tromboksan, leukotrieny nebo lipoxiny. Jejich zastoupení je poté větší než zastoupení metabolitů pocházejících z omega-3 MK. Metabolity pocházející z AA jsou aktivní už při malých koncentracích, pokud jsou jejich koncentrace vyšší kvůli špatnému stravování, přispívají ke vzniku trombózy, alergií, zánětlivých problémů (Simopoulos, 2002).

Kyseliny α -linolenová i linolová jsou metabolizovány na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Konečným produktem LA je kyselina arachnidová (AA), u ALA potom EPA a DHA.



Obr. 3 Metabolismus mastných kyselin.
Převzato z Komprda (2011).

Doplňky z rybího oleje mají prospěšný efekt na kardiovaskulární onemocnění (Calder, 2004), autoimunitní onemocnění a zánětlivá onemocnění, jako je lupénka (Mayser *et al.*, 2002), revmatickou artritidu (Galarraga *et al.*, 2008). Tento efekt rybího oleje (RO) je zapříčiněn vysokým obsahem PUFA n-3. RO z různých zdrojů obsahují různý obsah EPA a DHA, většina komerčně vyráběných má obsah EPA:DHA 2:1. Není ale jasné, jestli pozitivní dopad na imunitu má EPA, DHA nebo jejich kombinace. Prekurzorem EPA i DHA je kyselina α -linolenová. Tělo si ji neumí samo vytvořit a musí být přijímána v potravě (tzv. esenciální MK; Gorjão *et al.*, 2009).

Tab. 2 Přehled nenasycených mastných kyselin.

Zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/ (upraveno)

	Triviální název	Počet uhlíků:dvojných vazeb	Výskyt
MUFA	Kys. palmitoolejová	C16:1 (n-7)	Skoro ve všech tucích
	Kys. olejová	C18:1 (n-9, <i>cis</i>)	Přírodní tuky
	Kys. elaidová	C18:1 (n-9, <i>trans</i>)	Hydrogenované tuky
	Kys. eruková	C22:1 (n-9)	Řepkový a hořčicový olej
PUFA n-3	Kys. α -linolenová	C18:3	Lněný olej
	Kys. eikosapentaénová	C20:5	Rybí tuk, vejce
	Kys. dokosapentaénová	C22:5	Rybí tuk
	Kys. dokosahexaénová	C22:6	Rybí tuk
PUFA n-6	Kys. linolová	C18:2	Kukuřičný a sójový olej
	Kys. γ -linolenová	C18:3	Vejce, pupalkový olej
	Kys. arachidonová	C20:4	Podzemnice olejná

3.3 Zánět

Zánět je souhrn fyziologických reakcí na porušení integrity organismu. To vede k ochraně proti infikování poškozeného místa, k jeho lokalizaci a zhojení. Zánět může být vyvolán různými antigenními podněty: infekčními mikroorganismy, chemickými nebo fyzikálními vlivy. Klasické projevy zánětu jsou začervenání, bolestivost, otok a zvýšení teploty.

Zánět dělíme na akutní a chronický. Akutní zánět odezní obvykle bez následků a poraněná tkáň se kompletně zhojí. Chronický zánět vede v určité míře k destrukci tkáně a jejímu nahrazení vazivem. Akutní zánět je obranná reakce organismu, chronický zánět již bývá patologický.

Signály k rozvoji zánětu dávají jako první degranulované tkáňové žírné buňky a fagocyty, také látky uvolněné z poškozených buněk, všechny tyto signály působí lokálně na zvýšení permeability cév, prostupu plazmatické tekutiny do extravaskulárního prostoru, což vede k otoku, také dochází ke zvýšení expresí adhezivních molekul, zachycování fagocytů, lymfocytů a jejich průniku do tkání, aktivuje se koagulační a komplementový systém, dále se přidá bolest díky ovlivnění nervových zakončení a dojde ke změnám v regulaci teploty (Hořejší a Bartůňková, 2005).

U zánětu rozlišujeme čtyři fáze: iniciační (dochází k zahájení, aktivace mediátorů a chemotaxi imunitních buněk), amplifikační (dojde k zesílení zánětlivé odpovědi, do poškozené tkáně se dostává více leukocytů), destrukční (dochází k enzymatickému štěpení, fagocytóze patogenů a poškození buněk) a terminační (dochází k ukončení zánětlivé odpovědi, regeneraci a reparaci tkáně; Ferenčík, 2005).

Zánětlivé mediátory jsou chemické sloučeniny, které regulují zánět a odpověď organismu, patří sem například eikosanoidy, cytokiny nebo histaminy. Váží se na specifický receptor cílové buňky nebo stimulují buňky uvolňováním sekundárních efektorových molekul. Po uvolnění a aktivaci se mediátory rozpadají nebo jsou inhibovány enzymy nebo komplementem (Rubin *et al.*, 2011).

Eikosanoidy jsou sloučeniny odvozené od polyenových nenasycených mastných kyselin, které mají v řetězci 20 uhlíků. Jejich obecný účinek je zajištění buněčné

signalizace (účinkují na molekuly, které jsou napojené na G-proteiny). Mají mimořádně krátký poločas rozpadu v řádu minut. Eikosanoidy jsou syntetizovány buď z AA (kys. arachnidová) nebo z EPA. Eikosanoidy syntetizované z AA mají prozánětlivý efekt, zvyšují agregaci trombocytů a působí vazokonstrikčně, eikosanoidy syntetizované z EPA mívají mnohem mírnější účinky, mnohdy jsou tyto účinky zcela opačné než účinky eikosanoidů syntetizovaných z AA (Das, 2006).

Bylo prokázáno, že PUFA n-3, a to především DHA, mají protizánětlivé účinky. Mourek (2007) uvádí, že dlouhodobé užívání PUFA n-3 ve stravě průkazně zlepšuje imunitní systém. Mnoho studií se zabývá právě účinkem PUFA n-3 na funkce imunitního systému, na zmírnění příznaků u chronických zánětů a autoimunitních onemocnění.

Proces aktivace chronického zánětu hraje důležitou roli v patogenezi a rezistenci k inzulínu, klíčový mechanismus poskytuje spojení makrofágů s adipocytární tkání, jde o hlavní společný znak nemocí spojených s poklesem senzitivity k inzulínu (Schenk *et al.*, 2008). Dochází k migraci makrofágů do tukové tkáně a jater, následné aktivaci makrofágů, sekreci cytokinů a počátek zánětu (Schoelson *et al.*, 2007).

Ochranný vliv DHA prokázali autoři Figueroa *et al.* (2012), kdy sledovali její vliv na buněčné a molekulární změny u potkanů po poranění míchy. DHA snížila funkční deficity v akutní fázi po poranění, zlepšila pohybové funkce a došlo i ke zvýšení bílé hmoty v míše.

3.4 Cytokiny

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, jde o proteiny (tzv. tkáňové hormony) sekretované leukocyty a jinými buňkami, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému. Kromě sekretované formy cytokinů jsou některé zakotvené v cytoplazmatické membráně, je tak zajištěno jejich lokální působení, nedochází k jejich odplavování a zředování difúzí.

Účinky cytokinů jsou většinou pleiotropní (působí na několik druhů buněk) a působí v kaskádě. Cytokinový systém je často redundantní (jednotlivé cytokiny se mohou zastupovat). V tkáních mohou působit různým způsobem: autokrinně (působí přímo

na buňky, které ho produkují), parakrinně (působí na buňky v okolí) a endokrinně (působí na vzdálené tkáně po transportu cévním řečištěm).

Klasifikace cytokinů podle struktury (převzato z Hořejší a Bartůňková, 2005):

- Hemopoetiny – charakteristický strukturní rys těchto molekul je přítomnost čtyř α -helikálních úseků. Patří sem Il-2 – Il-7, Il-9, Il-11-15, Il-21, Il-23, G-CSF, GM-CSF a další.
- Interferony a rodina Il-10 – tyto molekuly obsahují pět α -helikálních úseků. Řadíme sem IFN- α , β a γ , Il-10, Il-20, Il-22, Il-24, Il-26, Il-28 a Il-29 a další.
- Skupina Il-12 – jde o nekovalentní heterodimery dvou strukturně odlišných podjednotek. Patří sem Il-12, Il-23 a Il-27.
- Skupina TNF – molekuly mají tvar tvořený sktíparalelními úseky polypeptidového řetězce. Cytokiny v této skupině se nejčastěji vyskytují v trimerní formě. Patří sem TNF, TNF- β , CD30L, CD40L, CD70 a další.
- Skupina TGF- β – charakteristická struktura je tzv. cystinový uzol, který kovalentně stabilizuje dimery těchto cytokinů. Patří sem TGF- β , BMP-7, GDNF.
- Chemokiny – jde o malé molekuly, které se dále podle struktury a uspořádání cystinových můstků dělí na CCL a CXCL. Patří sem velké množství molekul např. Il-8, MCP-1, MCP-2.
- Ostatní – patří sem cytokiny jako Il-1 α , Il-1 β , Il-14, Il-16, Il-25 nebo SCF.

Receptory cytokinů se skládají ze dvou nebo tří podjednotek. Jedna z nich zodpovídá za specifickou vazbu cytokinů, ty další zajišťují spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Právě signalizační podjednotka (např. CD132, KH97, CD130) je u mnoha cytokinů stejná a sdružuje je do několika skupin (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Modulace produkce leukocytárních cytokinů pomocí MK je asociována s jejími mnohými funkcemi, jako je ovlivnění proliferace, chemotaxe neutrofilů nebo aktivace makrofágů. PUFA n-3 snižují produkci prozánětlivých cytokinů modulovaných EPA a DHA s různými intenzitami. Autoři Weldon *et al.*, (2007) zjišťovali efekt čistých EPA a DHA na expresi cytokinů a nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B), aktivovaného v lidských THP-1 makrofázích. NF- κ B hraje klíčovou roli v regulaci transkripce genů pro cytokiny. Tento transkripční faktor je lokalizován v cytoplasmě a je asociován

s inhibičními proteiny I κ B. Extracelulární signály dokáží aktivovat IKK (I κ B kinázu), kdy dojde k fosforylaci proteinu I κ B α a tím jeho odpojení od NF- κ B. Následuje degradace I κ B α proteosomem. Nejčastěji se vyskytující forma NF- κ B je heterodimer p65/p50, kdy p65 obsahuje transkripční aktivační doménu. V odpočívajících buňkách je neaktivní NF- κ B izolovaný v cytoplasmě, a je navázaný na I κ B. Aktivace pomocí LPS vyžaduje postupnou fosforylaci I κ B a degradaci proteosomem doprovázenou translokací NF- κ B do jádra. Tam se naváže na specifickou sekvenci DNA – responzivní element pro aktivaci transkripce cytokinů. U THP-1 makrofágů ošetřených 100 μ M EPA a DHA došlo po stimulaci LPS ke snížení produkce TNF- α , IL-1 β a IL-6, v porovnání s kontrolními buňkami. Zároveň došlo i k redukcii exprese genů pro TNF- α , IL-1 β a IL-6. V obou případech byl vliv DHA větší než EPA. Pouze DHA významně snížila u makrofágů expresi jádrového p65 a zvýšila expresi cytoplasmatického I κ B. Závěrem tedy je, že DHA má pravděpodobně větší účinnost na zmírnění produkce prozánětlivých cytokinů než EPA, tento efekt je nejspíše zprostředkovaný NF- κ B a jeho větší afinitě k DHA (Ghosh *et al.*, 1998).

EPA soupeří s kys. arachnidovou o místo substrátu pro enzymy cyklooxygenázu a lipooxygenázu, které je konvertují na eicosanoidy, u DHA toto nebylo prokázáno. Autoři Lokesh *et al.* (1988) uvádějí, že myši peritoneální makrofágy obohacené o DHA produkují méně prozánětlivých leukotrienů, než buňky obohacené EPA, množství produkovaných cytokinů nebylo změřeno. Tato studie předpokládá, že efekt DHA na produkci prozánětlivých cytokinů se může lišit podle cesty syntézy eikosanoidů. V závislosti na získaných výsledcích v makrofázích, autoři Khalfoun *et al.* (1997) zmiňují zvýšený vliv na redukcii produkce IL-6 lymfocyty léčenými EPA s porovnáním s DHA. EPA a DHA podporuje inhibiční efekt u IL-2, IL-10 a IFN- γ produkované Jurkat buňkami (leukemická linie lidských T-lymfocytů; Verlengia *et al.*, 2004a), u linie B-lymfocytů (Rajovy buňky) snížila EPA a DHA produkci IL-10, TNF- α a IFN- γ (Verlengia *et al.*, 2004b). V těchto studiích byl supresivní efekt EPA na cytokiny výraznější než u DHA.

3.5 Genová exprese

Genová exprese nebo také využití genetické informace je proces, kdy dochází k přenosu genetické informace uložené v molekule DNA na funkční molekulu peptidu nebo buněčnou strukturu. Jde o dvoustupňový proces, nejdříve dojde k přepisu

(transkripce) struktury DNA do molekuly mRNA. Následně slouží mRNA jako templát v procesu translace (překlad), kdy dojde k syntéze primární struktury peptidu (pořadí aminokyselin). Dogma molekulární biologie říká, že může dojít k přenosu genetické informace pouze z DNA na RNA (z nukleové kyseliny na nukleovou kyselinu) nebo z DNA do proteinu (z nukleové kyseliny na protein), u některých virů dochází k překladu RNA na DNA (tzv. proces zpětné transkripce). Nikdy nemůže dojít k přenosu informace z proteinu zpět na nukleovou kyselinu. Pro zahájení transkripce je potřeba velké množství různých molekul, které interagují s vláknem DNA. Patří sem různé molekuly RNA-polymerázy, promotory, transkripční faktory, enhancery (zesilovače) a silencery (tlumiče) transkripce. Promotory genů jsou specifické a vysoce konzervativní sekvence vyskytující se vždy ve stejné vzdálenosti od počátku transkripce, mezi promotory řadíme TATA box, GC boxy, CAAT box a oktamerový box (Snustad a Simmons, 2009).

PUFA n-3 a n-6 modulují expresi celé řady genů, které se zúčastňují metabolismu mastných kyselin a modulaci zánětu. MK regulují genovou expresi přes interakci se specifickými transkripčními faktory, jako je rodina PPAR (receptory aktivované proliferátory peroxizomů). PUFA se vážou přímo na tyto receptory, které jsou následně přenášeny do jádra a vážou se na promotory specifických genů. Dochází tak k řízení exprese zvýšením nebo snížením transkripce (Sampath a Ntambi, 2006). PUFA také regulují expresi genů přes transkripční faktor NF- κ B (jaderný faktor kappa B), kdy inhibují syntézu NF- κ B v jádře a tím dochází ke snižování prozánětlivých eikosanoidů a cytokinů (Jump *et al.*, 2013).

Autoři Verlengia *et al.* (2004a) ve své studii ukázali, že exprese genů spojených s transdukcí signálu, přežitím buněk, apoptózou a produkcí cytokinů u Jurkatových buněk byla pozměněna při použití léčby 12,5 μ mol/l EPA a DHA, při době léčby 24 h. Zkoumali 83 genů pomocí metody microarray s použitím membrány z Clontech Laboratories. Po podání MK se změnila exprese u 62 % genů při působení DHA, u 33% genů při působení EPA a pouze 6 % genů bylo pozměněno u obou kyselin. DHA měla stimulační efekt na expresi genů spojených s obranou a opravou buňky. EPA zase ovlivňovala jiné geny, například onkogenní myc, c-jun a p53-asociovaný gen. Tyto výsledky ukazují, že molekulární mechanismy u T-lymfocytů, které jsou ovlivňovány PUFA n-3, jsou rozdílné. U Rajových buněk byl výsledek rozdílný, při

použití stejné léčby. EPA ovlivnila 25,9 % genů, DHA 8,4% a společný efekt byl u 3 % genů. Zvýšený efekt EPA může být asociován se zvýšenou proliferací buněk způsobením MK (Verlengia *et al.*, 2004b).

3.6 Rodina PPAR

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR) jsou skupina transkripčních faktorů. Byly popsány v 90. letech 20. století jako jaderné receptory způsobující proliferaci peroxizomů v krysích játrech. Patří do rodiny jaderných hormonálních receptorů, kterých je popsáných přes 48, patří sem také receptor pro vit. D, estrogenový receptor atd. (Kostadinova *et al.*, 2005).

Jsou tři izotypy PPAR - PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ (Escher *et al.*, 2001), každý je kódován jiným genem a mají rozdílné cesty exprese. PPAR α je exprimován hlavně v játrech a hnědé tukové tkáni, také v srdci, ledvinách, střevech a kosterní svalovině. PPAR β/δ je nejvíce transkribovaný izotyp, nejvíce je exprimován v mozku a trávicím traktu. PPAR γ je potom nejvíce exprimován v bílé i hnědé tukové tkáni, jeho exprese je i v lymfoidních orgánech, tlustém střevě, kosterní svalovině (Rosen a Spiegelman 2001).

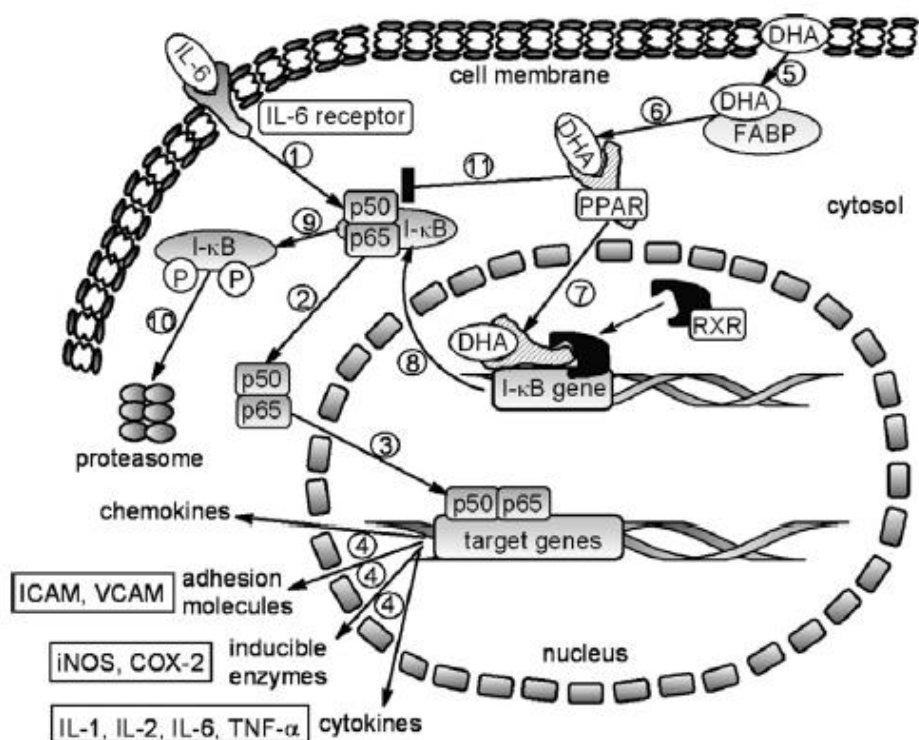
PPAR jsou aktivovány velkým množstvím endogenních molekul, tyto molekuly jsou zapojené v metabolických i zánětlivých procesech (Obr. 4). Polynenasycené MK jako kys. arachnidová nebo linolová jsou ligandy všech tří izotopů. Zatímco jejich metabolity vykazují větší afinitu k jednomu z těchto izotopů (Tan *et al.*, 2002).

PPAR γ je kódovaný stejnojmenným genem *PPARG*, ten je lokalizován na chromozomu 3. Rozlišujeme 4 různé izoformy - $\gamma 1$, 2, 3 a 4. Všechny izoformy hrají důležitou roli v diferenciaci adipocytů a v metabolismu glukózy (Evans *et al.*, 2004). K aktivaci PPAR γ dochází po navázání ligandu, jako ligand slouží přírodní i syntetické látky, hlavním ligandem jsou PUFA n-3 a n-6, hlavně potom EPA, DHA a AA plus jejich deriváty. Syntetických ligandů se využívá při léčbě mnoha onemocnění, například rosiglitazonu nebo pioglitazolu, které jsou používané k léčbě cukrovky II. typu (Kostadinova *et al.*, 2005). Aby byl PPAR γ schopný regulovat transkripci genů, je potřeba, aby se vyskytoval ve formě heterodimeru s retinoidním receptorem X (RXR), heterodimer se váže na specifickou sekvenci DNA cílových genů a reguluje tak jejich expresi (Rogue *et al.*, 2010). Funkce PPAR γ je regulována řadou dalších proteinových

molekul, které buď mají funkci stimulační (koaktivátory) nebo inhibiční (korepresory; Michalik *et al.*, 2006). Díky své schopnosti inhibovat expresi zánětlivých cytokinů hraje důležitou roli v imunitní odpovědi organismu. Řídí diferenciaci imunitních buněk a inhibuje zánětlivou odpověď makrofágů tím, že brání aktivaci dalších transkripčních faktorů, jako je NF- κ B (Majdalawieh a Ro, 2010).

PPAR γ byl popsán jako důležitý faktor v prasečí adipogenezi (Yu *et al.*, 2006, 2008). K aktivaci je nutné navázání ligandu (EPA a DHA) na aktivační doménu. Aktivovaný PPAR γ moduluje transkripci genů spojených s adipogenezí tím, že se naváže na jejich responsivní elementy v období diferenciaci adipocytů (Tontonoz *et al.*, 1994).

Stimulace replikace a diferenciaci preadipocytů na adipocyty byla u hlodavců aktivována vysokotukovou dietou (Belzung *et al.*, 1993). Tato dieta indukovala expresi PPAR γ . V prasečích preadipocytech došlo díky MK s dlouhým řetězcem k regulaci diferenciaci a indukci exprese adipocytárních genů (Ding a Mersmann, 2001).



Obr. 4 DHA potlačuje signální dráhu NF-κB přes transkripční faktor PPAR.

1 – prozánětlivý cytokin aktivuje NF-κB, 2 – aktivace NF-κB, 3 – NF-κB vstupuje do jádra a působí jako transkripční faktor na geny kódující prozánětlivé proteiny, 4 – transkripce a translace těchto genů, 5, 6 – vstup DHA do cytoplazmy buňky, 7 – aktivace PPAR skrz vytvoření dimeru s RXR, navázání na promotor I-κB genu, 8 – protein I-κB blokuje NF-κB, 9, 10 – fosforylace a degradace proteosomem, 11 – aktivovaný PPAR interferuje s NF-κB a inhibuje ho, takže nedojde k navázání na gen. FABP – protein vázající mastné kyseliny, ICAM – intracelulární adhezivní molekula, VCAM – cévní adhezivní molekula, COX – cyklooxygenáza, TNF – tumor nekrotický faktor. Převzato z Komprda et al. (2011).

3.6.1 GPR120

G protein spojené receptory (GPCRs) jsou důležitými signálními molekulami pro mnoho aspektů buněčných funkcí. Jsou členy velké rodiny, která má stejné strukturální motivy jako je 7 transmembránových helixů a schopnost aktivovat heterotrimerický G protein. Ligandy vážící se právě na GPCR stimulují různé buněčné odpovědi skrz sekundární buněčné dráhy, jako modulace produkce cAMP, cesta fosfolipázy C, iontové kanály (Schulte a Fredholm, 2003). Několika skupinami bylo zjištěno, že několik osamocených receptorů GPR40, GPR41, GPR43, GPR84 a GPR120 mohou být aktivovány volnými MK. MK s krátkým řetězcem aktivují GPR41 a 43 (Tazoe *et al.*, 2008), MK se středně dlouhým řetězcem aktivují GPR84 (Wang *et al.*, 2006), MK s dlouhým řetězcem aktivují GPR40 (Itoh *et al.*, 2003) a GPR120 (Hirasawa *et al.*, 2005). Tito autoři dokázali, že stimulace GPR120 volnými MK vede k zvýšení

koncentrace Ca^{2+} iontů a aktivaci ERK kaskády, která značí interakci s rodinou G proteinů. Ovšem fyziologická funkce GPR120 zůstává skrytá. V této práci (Young Oh *et al.*, 2010) bylo zjištěno, že se GPR120 vysoce exprimuje v tukové tkáni a je exprimován prozánětlivými makrofágy. Tato vysoká exprese naznačuje, že GPR120 by mohl hrát významnou roli u těchto typů buněk. Došlo ke stimulování GPR120 syntetickým ligandem a omega-3 MK a bylo pozorováno, zda aktivace GPR120 ovlivní zánětlivou odpověď indukovanou LPS nebo TNF- α . Zatímco nasycené MK jsou prozánětlivé a nenasycené neutrální, bylo zjištěno, že n-3 PUFA DHA a EPA (hlavní složka rybího oleje) vyvíjí účinný protizánětlivý efekt skrz GPR120.

3.6.2 Housekeepingový gen TBP1

TBP (protein vázající se na TATA-box) je transkripční faktor, který se specificky váže na sekvenci TATA-boxu a vytváří tak strukturu, která se označuje jako „koňské sedlo“. Tato sekvence se nachází asi 30 nukleotidů před začátkem transkripce. Hraje významnou roli v počátečních fázích transkripce. TBP je součástí transkripčního faktoru TFIID, který je nutný pro spuštění transkripce RNA polymerázou II. Zároveň se asociuje i s dalšími transkripčními faktory, které umožňují prepis různých RNA genů. Nachází se pouze u eukaryot a archeí (Rédei, 2008).

3.7 Izolace RNA

Izolace RNA je náročnější než izolace DNA kvůli tomu, že RNA je méně stabilní, je náročnější na izolaci a vyžaduje přísnější podmínky. Výchozí materiál je homogenizován za přítomnosti antioxidantních činidel (např. β -merkaptoetanol). Proteiny jsou odstraněny fenolem ekvilibrovaným vodou při 60°C. Oddělení jednotlivých frakcí se děje při chlazené centrifugaci. DNA jako kontaminant je odstraněna použitím DNáz, které musí být zbaveny RNáz. RNA se sráží ethanolem za přítomnosti LiCl a bývá uchovávána v roztoku pufru při -70°C. Získání co nejčistší a neporušené RNA je základem pro mnoho metod jako je RT-PCR, zakládání cDNA knihoven atd. (Šmarda *et al.*, 2005).

mRNA představuje jen malou část z celkové RNA buňky a její izolace je velmi obtížná. Využívá se tradiční metody, tedy izolace celkové RNA a následná separace jednotlivých typů (mRNA, rRNA a tRNA) nebo metody modernější, kdy je využíváno poly(A) konce u mRNA. Na tento konec se selektivně vážou specifické sondy, aniž by

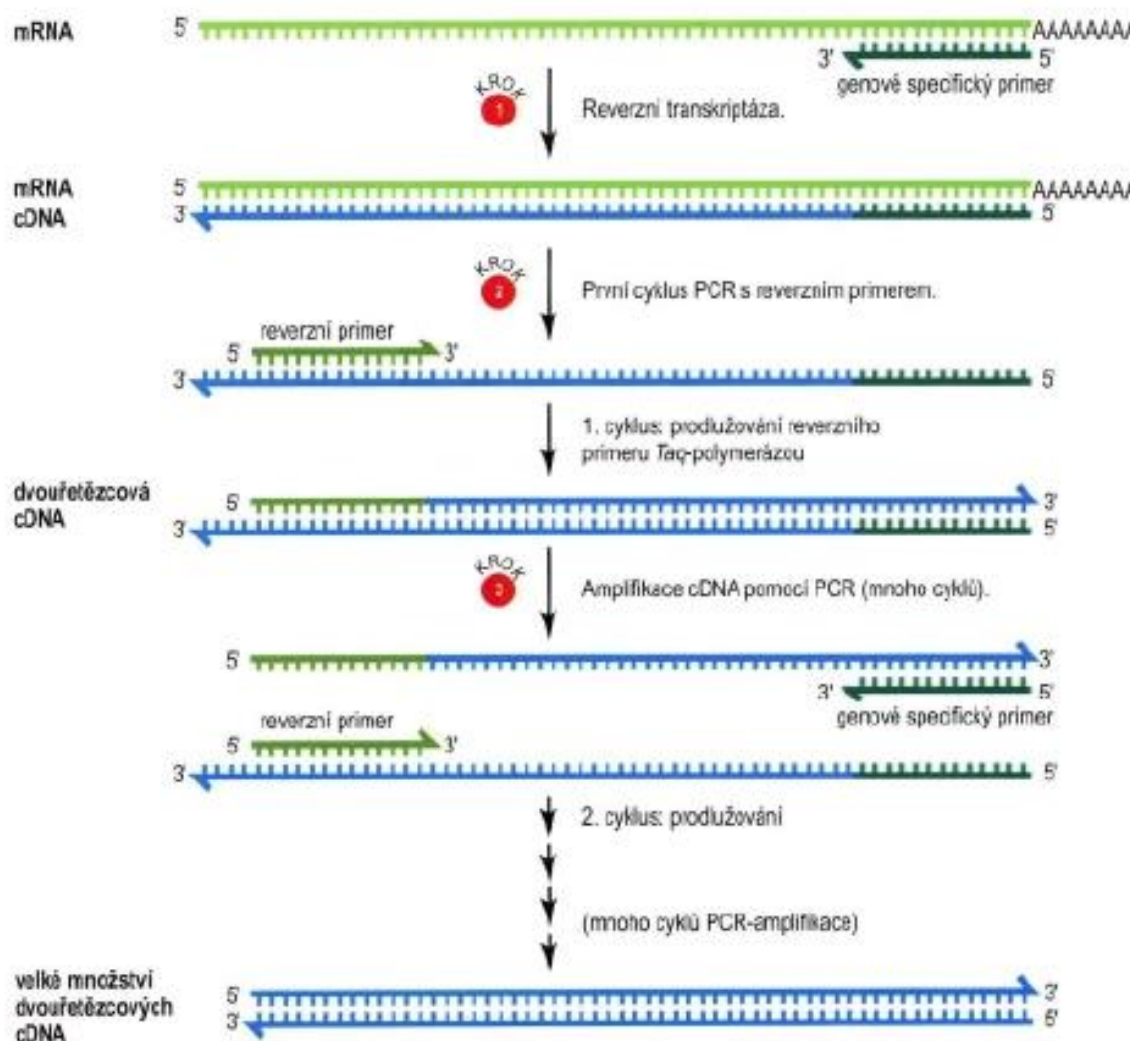
došlo k interakci s DNA nebo jiným typem RNA. Tyto sondy s navázanou mRNA jsou poté imobilizovány na pevném podkladu a promyty.

3.8 RT-PCR a kvantitativní PCR

Amplifikace DNA je prováděna výhradně *in vitro* a to metodou PCR (polymerázová řetězová reakce). K PCR potřebujeme syntetické oligonukleotidové komplementární sekvence, které ohraničují oblast zájmu. Metodu PCR vyvinul Kary Mullis, který za ni dostal Nobelovu cenu v roce 1993.

Metoda PCR zahrnuje tři kroky, které se v cyklech opakují. První krok je denaturace dvouvláknové DNA zahřátím reakční směsi na 95°C po dobu 30s. V druhém kroku dojde k nasednutí primeru, teplota je odvozena od sekvence primeru (obsah CG bazí, délka atd.), pohybuje se v rozmezí 50 až 60°C, doba opět 30s. Poslední krok je vlastní syntéza nového vlákna DNA při teplotě 72°C po dobu 1,5 min. Tento proces se několikrát opakuje a množství DNA exponenciálně roste až d o zastavení reakce nebo vyčerpání reagens. Přístroje pro PCR (termální cyklery) jsou plně automatizované, teplotu i čas mění sami.

Při RT-PCR (reverzně transkripční PCR, obr. 5) dochází k syntéze DNA z templátu, který je komplementární k RNA, to vše za pomoci enzymu reverzní transkriptázy. Prvním krokem je právě reverzní transkripce, z řetězce RNA je s genově specifickým primerem amplifikována cDNA (komplementární DNA), která je komplementární s původním řetězcem RNA. Další cykly už jsou klasická PCR se dvěma primery (přímý a zpětný). Tento postup představuje snadnou a rychlou cestu ke zjištění, zda byl konkrétní gen přepsán (Snustad a Simmons, 2009).



Obr. 5 Detekce a amplifikace RNA pomocí RT-PCR.
Převzato z Snustad a Simmons (2009).

Kvantitativní PCR (qPCR) je laboratorní technika, která se od klasické PCR liší tím, že dochází zároveň i ke kvantifikaci cílené DNA. U klasické PCR je produkt detekován až po skončení amplifikace pomocí elektroforézy. Při qPCR dochází k detekci vyzářeného fluorescenčního signálu ve speciálním cyklu, který umožňuje cyklické střídání teplot, detekci fluorescence a monitorování postupu PCR v reálném čase. Pro kvantitativní detekci produktu se používají různé metody – začleňování interkalačního barviva mezi dvouvláknovou DNA (SYBR green, jde o nespecifickou metodu) nebo specifické metody jako TaqMan sondy, molekulární majáky nebo FRET sondy (Šmarda *et al.*, 2005). K výpočtu exprese se používají hodnoty C_T (*cycle threshold*), v tomto okamžiku je množství DNA tak vysoké, že vystoupí z fluorescenčního šumu

a je jasně měřitelné. Při zjišťování exprese zkoumaného genu porovnáváme jeho C_T s hodnotou C_T referenčního genu (tzv. housekeeping gen), který má expresi stále stejnou. C_T je přímo závislé na počátečním množství DNA, čím větší množství DNA na počátku reakce, tím nižší hodnota C_T (Scheffe *et al.*, 2006).

4 METODIKA

4.1 Ustájení a výkrm prasat

Experiment probíhal v souladu se zákonem 246/1992 Sb. České národní rady k ochraně zvířat proti týrání, novelizace 162/1992 Sb. a byl schválen „Komisí na ochranu zvířat proti týrání“ Mendlovy univerzity v Brně a Ministerstvem zemědělství.

Do experimentu bylo použito 32 prasat s rovnoměrným rozložením pohlaví (16 samců a 16 samic), pocházela z Bioproduktu Knapovec a.s., Ústí nad Orlicí. V začátku experimentu měla 8 týdnů a jejich hmotnost byla 25,5kg s tolerancí $\pm 1,15$ kg. Byla ustájena v experimentárních stájích po čtyřech kusech.

Prasata byla rozdělena do dvou skupin, každá po 8 samcích a 8 samicích. Kontrolní skupina byla krmena 2,5% palmovým olejem (P skupina), experimentální skupina potom 2,5% rybím tukem (R skupina), byla dodržena izokalorická i isolipidická výživa. Krmivo obou skupin prasat obsahovalo v jednom kilogramu 138g hrubého proteinu (kvantifikovaný pomocí KD-310-A-1015 KjelROC analyzátoru), 56g tuku (zjišťovaný extrakcí hexan/2-propanol), 48g hrubé vlákniny (detekována za pomoci ANCOM220 Fiber analyzátor) a 758g nedusíkatých látek (dopočítaný jako zbytek do 100%). Energetický obsah krmiva byl 13,6MJ na Kg. Dále byla prasata krmena základním kompletním krmivem, které bylo lisované do pelet. Krmivo bylo nakupováno od firmy De Heus, Marefy, Česká republika, skládalo se z pšenice, ječmene, pšeničných otrub, tmavého mláta, výtažku z řepkových semen, uhličitanu sodného, živočišného tuku, soli, premixu vitamínů a minerálů. Tyto pelety byly namlety a homogenizovány s příslušným množstvím testovaného oleje. Obsah fyziologicky a kvantitativně důležitých mastných kyselin v dietách P a F je uveden v tabulce 3.

Tab. 3 Množství jednotlivých MK v dietách.

Počet uhlíků : počet dvojných vazeb	Triviální název	Zastoupení v F dietě (g*kg ⁻¹)	Zastoupení v P dietě (g*kg ⁻¹)
14:0	Kys. myristová	0,92	0,96
16:0	Kys. palmitová	6,79	14,78
18:0	Kys. stearová	1,30	1,73
18:1	Kys. olejová	9,56	13,97
18:2 n-6	Kys. linolová	11,55	10,61
18:3 n-3	Kys. α -linolenová	0,88	0,77
20:5 n-3	Kys. eikosapentaénová	2,83	0,05
22:5 n-3	Kys. dokosapentaénová	0,58	0,04
22:6 n-3	Kys. dokosaheptaénová	4,34	0,05

Zvířata byla krmena denně *ad libitum* a měla volný přístup k pitné vodě, krmná dávka byla zkrmována nadvakrát (první krmení bylo v sedm hodin ráno a druhé ve dvě hodiny po poledni). Dvakrát denně se odečítaly zbytky, aby bylo vypočítáno faktické množství krmiva, které bylo prasaty zkonsumováno. Kvůli krmení *ad libitum* byl předpoklad, že nebyl rozdíl ve zkonsumovaném krmivu mezi jednotlivými prasaty v kóji. Prasata byla vážena každý týden a celkový výkrm trval 70 dní.

4.2 Aplikace LPS a odběr vzorků

4.2.1 Stimulace LPS

Poslední den výkrmu byla každá skupina prasat, tedy skupina krmena palmovým olejem (16 kusů) a skupina krmena rybím tukem (16 kusů), náhodně rozdělena na polovinu (po 8 a 8 kusech) a této polovině byla aplikována intra venózně dávka *E.coli* LPS v množství 25 μ g na kilogram živé hmotnosti prasete. Po třech hodinách byla prasatům intra muskulárně podána anestézie – směs TKX (ketamin v koncentraci 12mg/ml, xylazine 12,5mg/ml, tiletamine 12,5mg/ml a zolazepam 12,5mg/ml v celkovém objemu 0,2ml na kilogram živé hmotnosti). Poté byla prasata usmrcena vykrvácením a byly odebrány vzorky krve, tuku a jater z každého prasete.

Po stimulaci LPS došlo k vytvoření 4 experimentálních skupiny. Skupina prasat krmena dietou s přídavkem 2,5% palmového oleje (P-), skupina krmena dietou s přídavkem 2,5% palmového oleje a stimulovaná LPS (P+), skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje (R-) a skupina krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje stimulovaná LPS (R+).

4.2.2 Odběr vzorků

Krev byla odebrána z aorty do heparinem potažených flakonek. Následně byla stočena v centrifuze při 200g po 10min při 4°C k získání plazmy. Játra a tuk (viscerální tuková tkáň) byly odebrány v množství 200g. 100g tukové i jaterní tkáně bylo lyofilizováno a skladováno při -20°C pro analýzu mastných kyselin. Z druhé poloviny bylo odebráno 50mg pro izolaci RNA.

4.3 Kvantifikace genové exprese

Celková RNA byla izolována z jater za použití RNA kitu – Rneasa Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Koncentrace byla měřena na NanoDropu 2000 UV-Vis spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). RNA byla následně skladována při -80°C. 1µg byl zpětně transkribován za použití M-MLV reverzně transkripčního systému (Invitrogen, Paisley, Velká Británie) a oligo-dT primerů. Získaná cDNA byla analyzována kvantitativní PCR (qPCR) za pomoci specifických primerů (Tab. 4). Jako housekeepingový gen byl použit TBP1, který byl vybrán na základě výsledků z testu stability genových expresí.

Expese RNA byla kvantifikována ve třech opakováních s finálním objemem 3µl v 384 jamkových destičkách za použití QuantiTect SYBR Green PCR master mix při dodržení doporučeného postupu (Qiagen, Hilden, Německo) na LightCycler 480 (Roche Applied Science). Kvantitativní PCR proběhla na Nanodrop II liquid dispenser (Innovadyne Technologies, Rohnert Park, Kanada). Byl dodržen výrobní protokol reakce při následujících podmínkách: denaturace při 95°C na 15 min, amplifikačních cyklů bylo 45 a probíhali při 95°C po 15 s, 58°C po 30 s a 72°C po 30 s. Křivky tání byly analyzovány k ověření specifity produktu (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit a ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Použitá reakční směs se skládala z 0,5 µl cDNA, 1,5 µl SYBR[®] Green PCR Master Mix

a 10 pmol každého z primerů (přímý a zpětný, Generi Biotech, Hradec Králové, česká republika).

Změny expresí testovaných genů, vztažených k TBP1, u prasat krmených rybím olejem (skupina R) byly počítány dle relativní kvantifikace (Scheffe *et al.*, 2006) a byly vztaženy k expresi daného genu u kontrolní skupiny, kterou tvořila prasata krmená palmovým olejem a nestimulována LPS (skupina P-, gen byl také vztažen k TBP1). Dle Hellemans *et al.* (2007) byly vypočítány hodnoty normalizované relativní kvantifikace, které sloužily jako vstupní data pro statistické analýzy.

Tab. 4 Přehled primerů

Gen	Přímý primer	Zpětný primer	NCBI
TBP1	AACAGTTCAGT AGTTATGAGCC AGA	AGATGTTCTCAA ACGCTTCG	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nygaard%2C+Jorgensen+et+al+BMC+Molecular+Biology+2007
GPR120	TCTCCTGGGAT GTGTCGTTTGT	TCCTTGATGCCTT GGTGATCTGT	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/325652149?report=gbwithparts
PPARG	ATTATTCTCAGT GGAGACCGCCC	AGGCTTGCAGCA AATTGTCTTGA	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/47523813?report=gbwithparts
LBP	ACCGCTCCCCA GTTGGCTTC	AGCGCGGCGGAC ACATTAGT	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/190360654
ICAM1	CGGTGGCAGCC GTGGCTATC	TTGATGCAGCCC CGCTCGTC	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/55742637
IL-4	TCGGCACATCT ACAGACACC	CTTCTTGGCTTCA TGCACAG	http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511005475
IL-10	TGAAGAGTGCC TTTAGCAAGCT C	CTCATCTTCATC GTCATGTAGGC	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22817641
TGF-β1	TACGCCAAG GAGGTCACCC	CAGCTCTGCCCG AGAGAGC	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14663153
IL-1β	GGGACTTGA AG AGAGAAGTGG	CTTCCCTTGAT CCCTAAGGT	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=pavlova+spi-1

4.4 Analýza mastných kyselin

Lyofilizované vzorky jater a tuku byly homogenizovány v Moulinex mixéru (model D56, Moulinex, Francie) a následně transferovány do 150 ml Erlenmeyerovy baňky. Ke vzorku bylo přidáno 30 ml hexane/2-propanol mixu 3:2 (HIP 1) a vše bylo 15 minut sonikováno s použitím aparatury PS10000 (Notus-Powersonic, Vrábce, Slovensko). Extrakt byl filtrován přes Büchnerovu nálevku a k filtrátu bylo přidáno 24 ml Na₂SO₄. Po míchání a separaci vrstev v separační nálevce, n-hexan vrstva byla filtrována přes bezvodou Na₂SO₄ do 50 ml odměrné baňky. Vodná vrstva byla re-extrahována v 10 ml HIP2 (hexan/2-propanol 7:2). Hexanová vrstva byla opět filtrována přes bezvodou Na₂SO₄ a transferována do 50 ml odměrné baňky. Oba hexanové filtráty byly slity do 100 ml baňky s kulatým dnem a obsah byl odpařen při 40°C na rotačním vakuovém odpařováku (model RV 05-ST 1P-B; IKA Labortechnik, Staufen, Německo). Odpařování bylo ukončeno nitrogenem a množství lipidů bylo stanoveno gravimetricky.

Do roztoku 50 mg extrahovaných lipidů byly přidány 3 ml standardizovaného roztoku (15:0) a 1 ml dibutyl hydroxytoluenu. Po 5 min sonikace byly přidány 2 ml 0,5 mol/l roztoku CH₃ONa rozpuštěného v methanolu a vše bylo vařeno 5 min pod zpětným chladičem. Poté byly přes kondenzátor přidány 2 ml čtrnáctiprocentního roztoku BF₃ rozpuštěném v methanolu a vše se za stejných podmínek vařilo dalších 5 min. Po ochlazení vzorku byly přidány 2 ml isooktanu, vzorek by třepán a následně nechán minutu v klidu. Bylo přidáno 5 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného a směs byla energicky třepána 15 s. Byla odebrána organická vrstva a 1 ml této vrstvy byl použit pro stanovení plynovou chromatografií.

Methylestery mastných kyselin (FAME = fatty acid methyl ester) byly separovány za použití HP 6890 chromatografu (Hewlett-Packard) na Innowax kapilární koloně (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm; Agilent Technologies, J&W Scientific, Santa Clara, Kalifornie, USA). Teplota při nanášení a detekci byla 260 °C a 275°C. Zvyšování teploty probíhalo následovně: 150°C/1 min → zvyšování teploty o 10°C za minutu do dosáhnutí teploty 200°C → zvýšení teploty na 260°C po 3°C za minutu → teplota udržována po dobu 3 min. Nosný plyn byl dusík, rychlost proudění byl 1ml/min při tlaku 145 kPa a rozptyl 60:1. Jako externí standard pro identifikaci FAME bylo použito PUFA no. 2 (Supelco, Bellefonte, Pensylvánie, USA).

Obsah mastných kyselin v játrech, tuku a krmivech byl stanoven po extrakci lipidů postupem popsáným v článku Komprdy *et al.* (2016).

Obsah mastných kyselin v rybím a palmovém oleji byl vyjádřen jako procentuální podíl z determinovaných mastných kyselin. Obsah MK v krmivu a v játrech byl vyjádřen v mg na 100 g krmiva nebo jater.

4.5 Statistické vyhodnocení

Normalita rozložení dat byla testována pomocí Kolmogorova-Smimovova testu. Rozložení bylo normální, rozdíly mezi jednotlivými krmnými zásahy byly tedy testovány jednostupňovým tříděním analýzy rozptylu *s post-hoc* Tukeyovým testem. Pro tyto analýzy byl použit program STATISTICA 12 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Přírůstky hmotnosti

Denní příjem krmiva prasat na R a P dietě byl 880 respektive 890 g*den⁻¹, při přepočítání na kilogram živé hmotnosti to bylo 10,5 a 10,6 g na kilogram živé hmotnosti na den. Denní přírůstek hmotnosti prasat na R dietě byl 0,85 ± 0,05 kg*den⁻¹ a jejich finální hmotnost byla 83,64 ± 1,82 kg. U prasat na P dietě byl denní přírůstek 0,86 ± 0,04 kg*den⁻¹ a finální hmotnost byla 84,06 ± 3,35 kg. Nebyl zjištěn žádný vliv dietárního oleje na výše zmíněné proměnné (P > 0,05).

Příjem EPA a DHA u prasat byl 30 ± 0,5 a 46 ± 0,5 mg*kgW⁻¹*d⁻¹. Uložené množství EPA ± DHA v játrech bylo 530 u R a 129 u P, v tuku potom 1365 u R a 191 u P diety v mg/100g čerstvé hmoty.

5.2 Genová exprese

5.2.1 GPR 120

Podle funkce membránového receptoru GPR120, který je kódován genem *GPR120*, u kterého byla pozorována změna exprese, byla stanovena tato hypotéza: Exprese genu GPR120 by se měla zvýšit u skupiny krmené přídatkem rybího oleje a to z důvodu, že

receptor GPR120 je ligandem EPA a DHA a tedy při zvýšení jejich koncentrace v krvi by mělo dojít k nárůstu jeho potřeby a tím pádem i ke zvýšení transkripce a následně i translace daného genu.

Podle dat vypočítaných relativní kvantifikací měla exprese GPR 120 v játrech tendenci se zvyšovat ($P > 0,05$) oproti kontrole (Obr. 6). Jako kontrola byla stanovena skupina prasat krmená palmovým tukem (P-), která nebyla na konci experimentu stimulována LPS. Měla proto expresi genu danou jako 100%. Expres u skupiny P+ (prasata krmená palmovým olejem a stimulovaná LPS) byla 2,14 krát vyšší než kontrola ($P > 0,05$), u R- (prasata krmená rybím olejem, která nebyla stimulována LPS) byla vyšší 1,64 krát ($P > 0,05$), u R+ (prasata krmená rybím oleje a stimulována LPS) byla 2,34 krát vyšší ($P > 0,05$). Mezi testovanými skupinami nebyla zjištěna statistická významnost ($P > 0,05$).

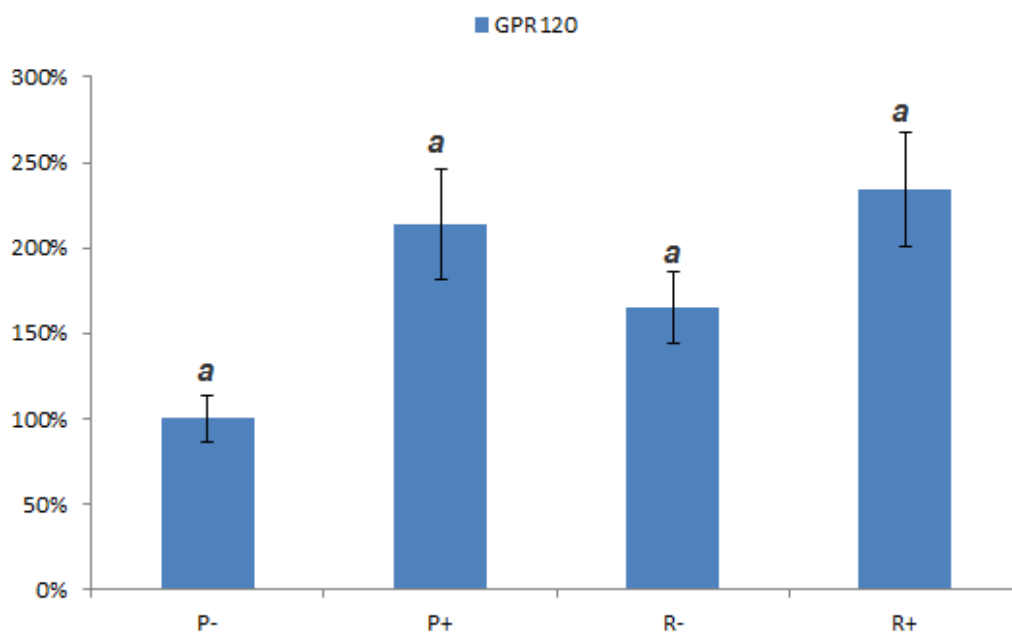
V tukové tkáni měla exprese genu *GPR120* také tendenci se zvyšovat ($P > 0,05$) u všech skupin (Obr. 7). Nejvyšší exprese byla u skupiny R+, zvedla se na 382,26%, u skupiny R- na 241,96% a u skupiny P+ na 155,74%. Mezi skupinami nebyla prokázána statistická významnost ($P > 0,05$).

Není žádná jiná studie, které by zkoumala vliv EPA a DHA na chronický zánět, kdy by jako modelový organismus použili prase, není proto možné srovnat výsledky s jinými pracemi.

Autoři Oh *et al.* (2010) prováděli experiment na dvou liniích myší. Jedna linie měla knock-out genu *GPR120* a druhá linie byla wild-type. Studovali, jestli u myší s deletovaným genem *GPR120* dojde ke zvýšení prozánětlivé odpovědi, zvýšení intolerance glukózy a snížení senzitivity k inzulínu. Myši byly nejdříve krmeny vysoce tukovou dietou a následně byla půlka z nich léčena přídatkem ω -3 MK (50mg DHA a 100mg EPA). Výsledky vyšly podle očekávání – u wild-type myší došlo ke zvýšení senzitivity vůči inzulínu, zato u myší s knock-outem nebyla pozorována žádná změna.

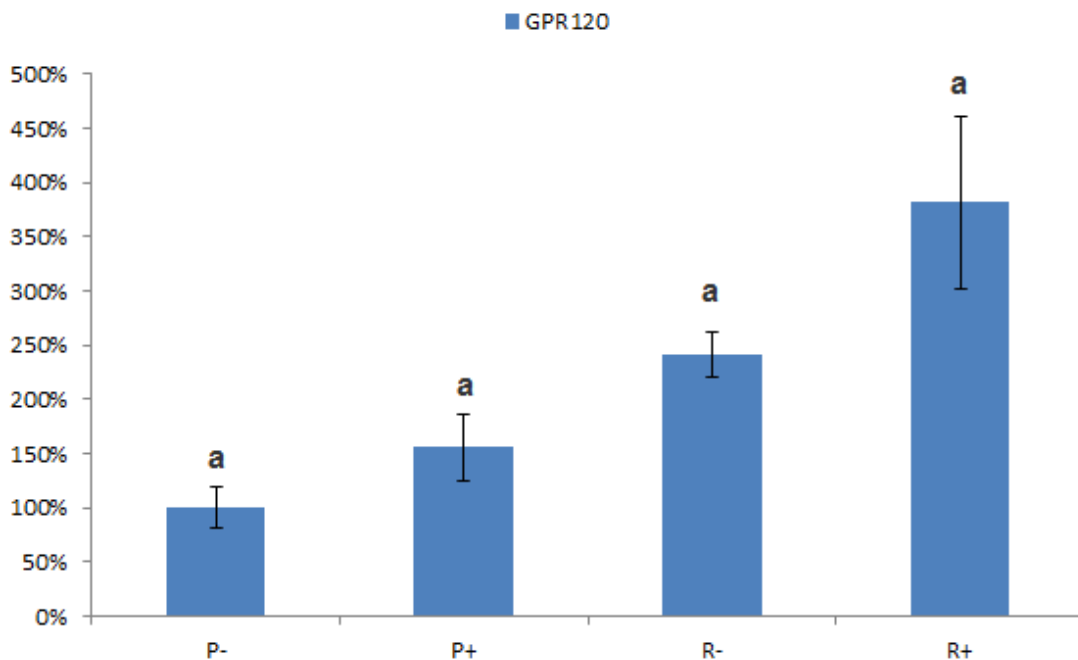
Ve studii Williams-Bey (2014) je uvedeno, že makrofágy kostní dřevě u myší produkují malé množství GPR120 i bez přímé stimulace, ale s přídatkem DHA v médiu. Po stimulaci LPS se exprese markantně zvýšila. Bylo dokázáno, že DHA používá k potlačení zánětlivé reakce primárně receptor GPR120.

Autoři Komprda *et al.* (2016) prováděli experiment na potkanech, kdy došlo naopak ke snížení exprese genu pro *GPR120* v játrech oproti kontrole (skupina krmena hovězím lojem), a to jak ve skupině krmené rybím olejem (zdroj EPA), tak ve skupině krmené *Schizochytrium* olejem (zdroj DHA).



Obr. 6 Relativní exprese genu GPR120 v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené stejnými písmeny se průkazně neliší ($P > 0,05$).



Obr. 7 Relativní exprese genu GPR120 v tukové tkáni.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené stejnými písmeny se průkazně neliší ($P > 0,05$).

5.2.2 PPAR γ

EPA a DHA jsou endogenní ligandy PPAR γ , ten po aktivaci zvyšuje množství adiponektinu a protizánětlivých hormonů v tukové tkáni. Proto by mělo dojít ke zvýšení exprese PPAR γ u skupin krměných rybím olejem.

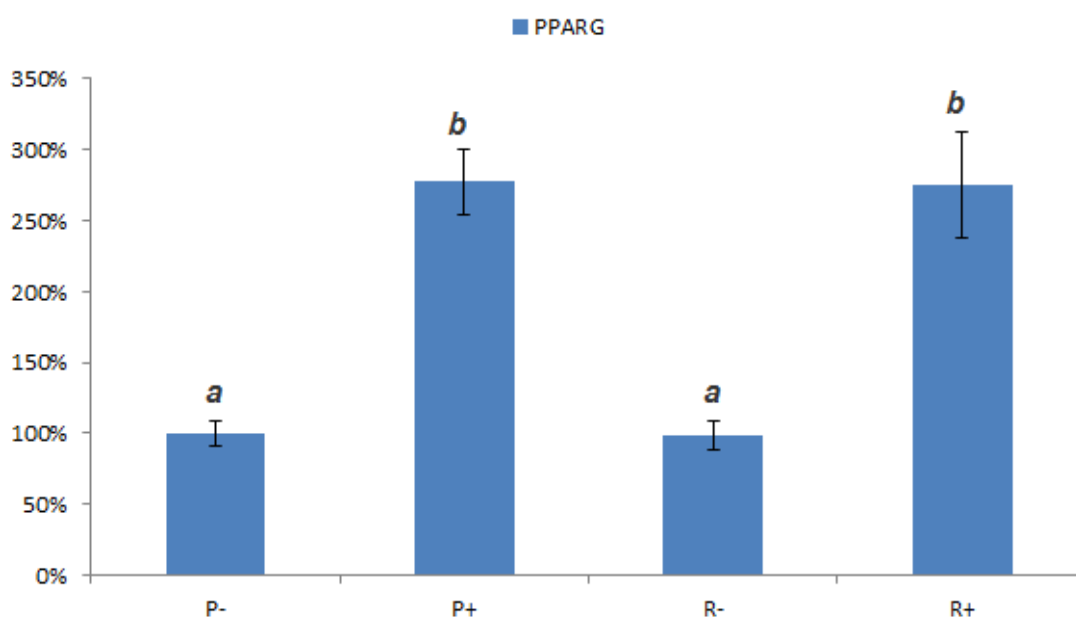
V játrech (Obr. 8) byla ovšem exprese u skupiny R- spíše snížena (99,12%), u skupiny, které byly stimulovány LPS došlo ke zvýšení a to u P+ na 277,48% a u R+ na 275,51%. Statistická významnost ($P < 0,05$) byla zjištěna mezi skupinami P- a R- proti P+ a R+.

V tukové tkáni (Obr. 9) byla zjištěna tendence ke zvýšení exprese ($P > 0,05$). Proti kontrole (skupina P-, 100%) došlo ke zvýšení u P+ o 76,14%, u skupiny R- o 52,25% a u skupiny R+ o 98,38%. Mezi skupinami nebyla prokázána statistická významnost ($P > 0,05$).

I v dalších studiích se potvrzuje zvýšení exprese PPAR γ po působení EPA/DHA. Autoři Yu *et al.* (2008) provedli experiment, kdy sledovali vliv jednotlivých MK

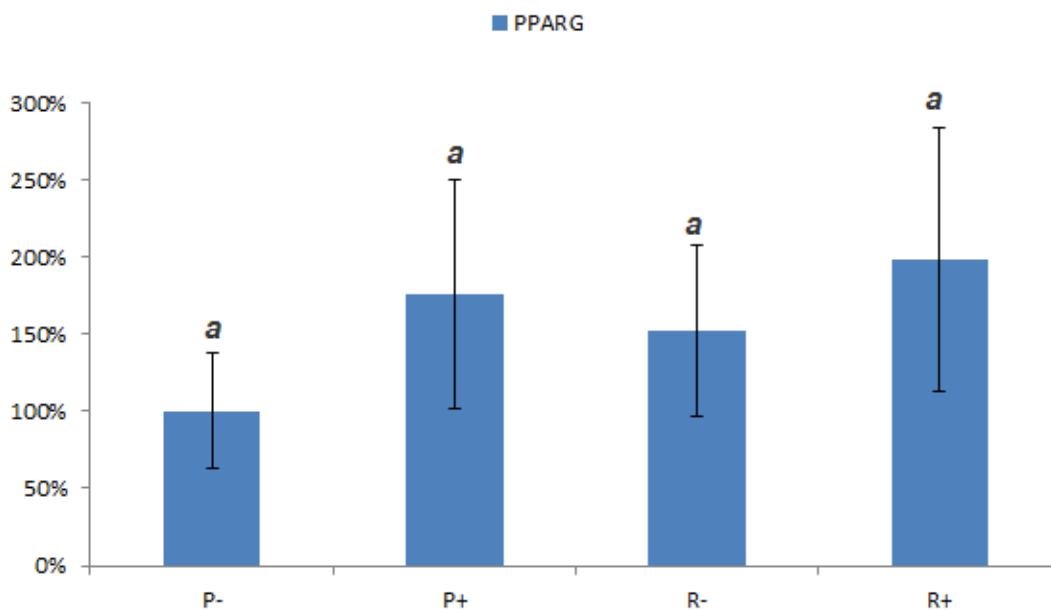
na aktivaci PPAR γ v linii myoblastů. Expresí prasečího PPAR γ byla zvýšena při přidání DHA do adipogenního média. Odpověď byla pozitivně spojena se zvyšující se koncentrací DHA. Dále uvádí (Yu *et al.*, 2008), že u modelových organismů závisí při aktivaci PPAR γ pomocí DHA na době působení na organismus: u prasat docházelo k lineárnímu zvyšování exprese genů pozitivně ovlivňující adipogenezi (PPAR γ , PPAR α atd.) v závislosti na délce krmení dietou obsahující α -linolenovou kyselinu (Luo *et al.*, 2009).

Další experiment prováděný autory Yu *et al.* (2010) zahrnoval transgenní myši s vneseným prasečím PPAR γ genem, které exprimovaly gen kódující β -oxidaci více myši krmené EPA/DHA, než myši divokého typu. Je předpoklad, že PPAR γ má odlišné funkce u hlodavců než u prasat (Weber *et al.*, 2008). Liší se také hlavní orgány sloužící pro *de novo* tvorbu lipidů. U prasat se tak děje spíše v tukové tkáni, u lidí a hlodavců dochází k lipogenezi spíše v játrech (Duran-Montgé *et al.*, 2009).



Obr. 8 Relativní exprese genu PPAR γ v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší (P<0,05).



Obr. 9 Relativní exprese genu PPAR γ v tukové tkáni.

Osa Y: Relativní exprese (P-=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené stejnými písmeny se průkazně neliší ($P>0,05$).

5.2.3 LBP

LBP je protein, který je kódován u lidí stejnojmenným genem – *LBP*. Jeho funkce v organismu je rozpoznání a zachycení lipopolysacharidu. Ten se poté váže na receptory buněk imunitního systému. Podílí se na akutní fázi zánětu, proto by měla jeho exprese po stimulaci LPS být výrazně zvýšena.

Expresa LBP v játrech (Obr. 10) vyšla podle očekávání, oproti kontrolní skupině P- (100%) byla exprese skupiny stimulované LPS (P+) zvýšena na 550,40% ($P<0,05$), u skupiny stimulované LPS a krmené rybím tukem (R+) byla exprese 742,29% a u skupiny krmené rybou (R-) měla exprese tendenci zvýšení jen na 130,94% ($P>0,05$). Skupiny R+ a P+ se statisticky významně liší ($P<0,05$) od skupin, které nebyly stimulovány LPS.

Expresa LBP v tukové tkáni (Obr. 11) nebyla zvýšená ($P<0,05$) o tolik jako v játrech. U skupiny stimulovaných LPS stoupla jen na 215,02% (P+) a 442,14% (R+), skupina R- měla skoro dvojnásobnou expresi – 194,04% ($P>0,05$). Statistická

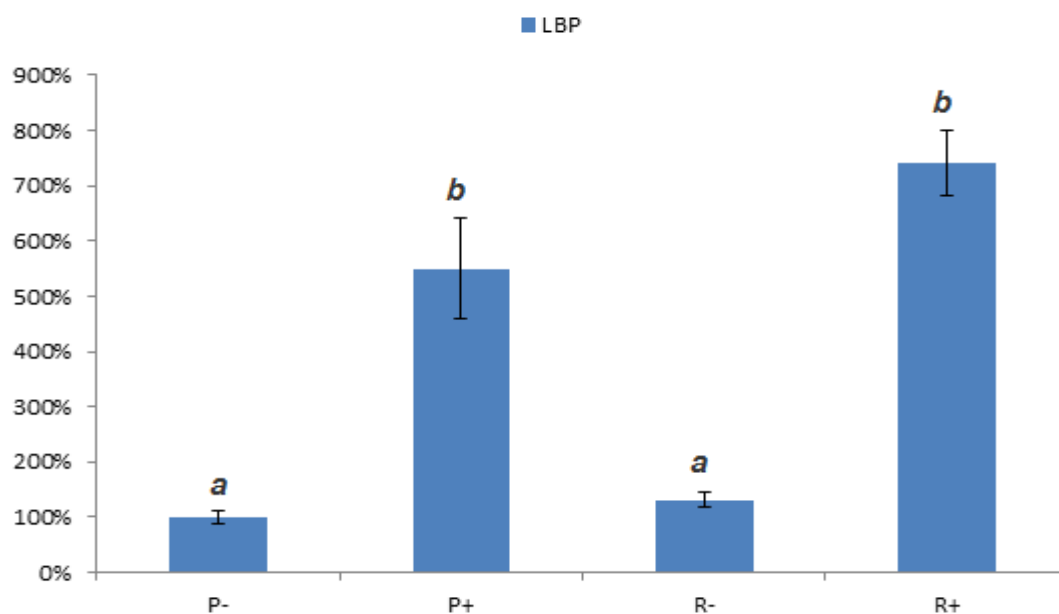
významnost ($P < 0,05$) byla prokázána pouze mezi skupinou kontrolní (P-) a skupinami stimulovanými LPS (P+ a R+).

Našla jsem pouze jednu studii, která se zabývala množstvím LBP přímo v játrech. V této studii byly tři experimentální skupiny myši, první byla krmena izokalorickou dietou (kontrolní skupina) a druhá a třetí skupina byla krmena dietou s přídavkem PUFA n-3 (druhá skupina měla v dietě 5% přídavek, třetí 10%). U myši nedošlo k žádné další stimulaci, bylo zjištěno snížené množství LBP v játrech u myši kmenými PUFA n-3 dietami oproti kontrole (Hassanali *et al.*, 2010).

Další studie se zabývala transportem prozánětlivých endotoxinů v krevní plazmě. Nejvyšší koncentraci LBP v plazmě vykazovala skupina krmená vysoko tukovou dietou. Rozdíly v množstvích byly nalezeny pouze mezi skupinami myši kmenými vysoko tukovou dietou, nízko tukovou dietou a dietou, která obsahovala PUFA n-3 vázané ve fosfolipidech. Mezi skupinami kmenými PUFA n-3 vázanými ve fosfolipidech nebo v triacylglycerolu nebyly nalezeny významné rozdíly (Awada *et al.*, 2013).

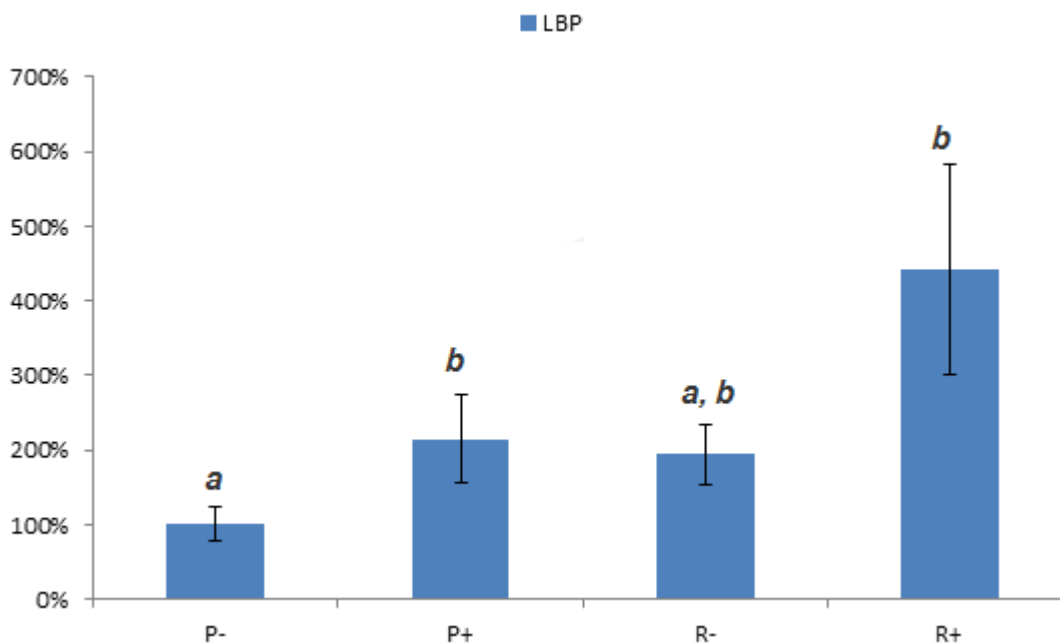
Autoři Hou *et al.* (2012) prováděli studii na myších, kterým byla indukována cukrovka 2. typu. U těchto myši došlo ke zvýšení exprese LBP v srdci. Tento jev mohl souviset s větší potřebou energie a tedy vyšším množstvím volných MK, které byly jako energetický zdroj dopravovány do mitochondrií.

Studie prováděná na lidských neuroblastomech sledovala schopnost začlenění DHA do plazmatické membrány a následnou mRNA expresi vybraných genů vč. *LBP*. Linie SH-SY5Y lidského neuroblastomu byla kultivována v médiích s přídavky α -LNA, EPA, DPA a DHA, v různých koncentracích. Výsledky exprese mRNA byly sledovány, u buněk kultivovaných v EPA médiu, po 16h a 48h. Exprese LBP zůstala po dobu kultivace téměř neměnná. U ostatních genů došlo ke zvýšení exprese, ovšem spíše v závislosti na čase než na přídavku různých koncentrací EPA do média (Langelier *et al.*, 2005).



Obr. 10 Relativní exprese genu LBP v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P-=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší ($P < 0,05$).



Obr. 11 Relativní exprese genu LBP v tukové tkáni.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší ($P < 0,05$).

5.2.4 ICAM 1

ICAM 1 (nebo-li CD54) patří do superrodiny ICAM (intracelulární adhezivní molekula), nachází se na epiteliálních buňkách a umožňuje přichycení leukocytů. Jejich exprese se zvyšuje působením některých cytokinů.

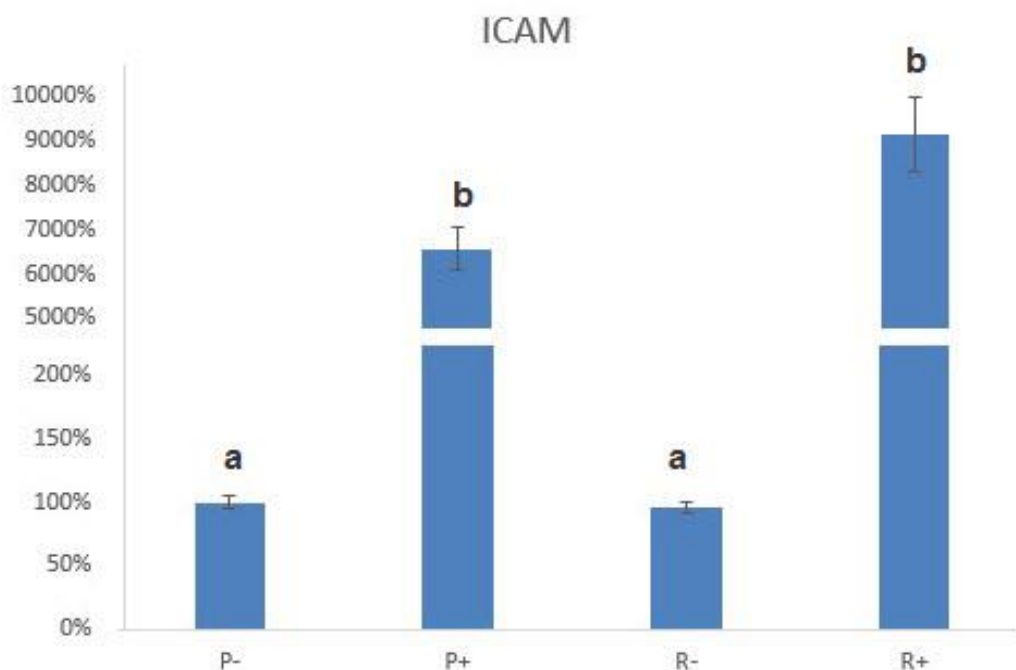
Výsledky předkládané práce ukazují extrémně velký nárůst exprese ($P < 0,05$) v játrech u skupin, které byly stimulovány LPS (Obr 12). U skupiny P+ byla exprese stanovena na 6526,97% a u skupiny R+ na 9093,93%. Skupina R- měla tendenci menší exprese než kontrola, a to 96,30% ($P > 0,05$). Mezi skupinami stimulovanými LPS a bez stimulace byla prokázána statistická významnost ($P < 0,05$).

V tukové tkáni (Obr. 13) byla exprese u skupin stimulovanými LPS taky zvýšená ($P < 0,05$), ale už ne tak moc, jako v játrech. U skupiny P+ byl nárůst na 3192,97% a u skupiny R+ na 3634,14%. Naopak došlo ke zvýšení exprese i u skupiny R- na 187,63%. Statistická významnost ($P < 0,05$) byla prokázána jen mezi skupinou P- a skupinami stimulovanými LPS (P+ a R+).

Studie, prováděná na myších krmených intravenózně infuzí obohacenou buď o olej ze sójových bobů (SO) nebo o rybí olej (RO), kdy následně došlo ke stimulaci LPS, byla sledována expresi *ICAM-1* v plicích. Po stimulaci LPS byla u myší krmených s přidavkem sojového oleje signifikantně zvýšena regulace exprese *ICAM-1*. U myší krmených dietou s přidavkem rybího oleje naopak došlo k významné redukci exprese transkriptu pro tento gen. Studie tedy jasně prokázala, že náhrada RO za SO měla za následek inhibici transkripčních faktorů mRNA pro *ICAM-1* (Kohama *et al.*, 2014).

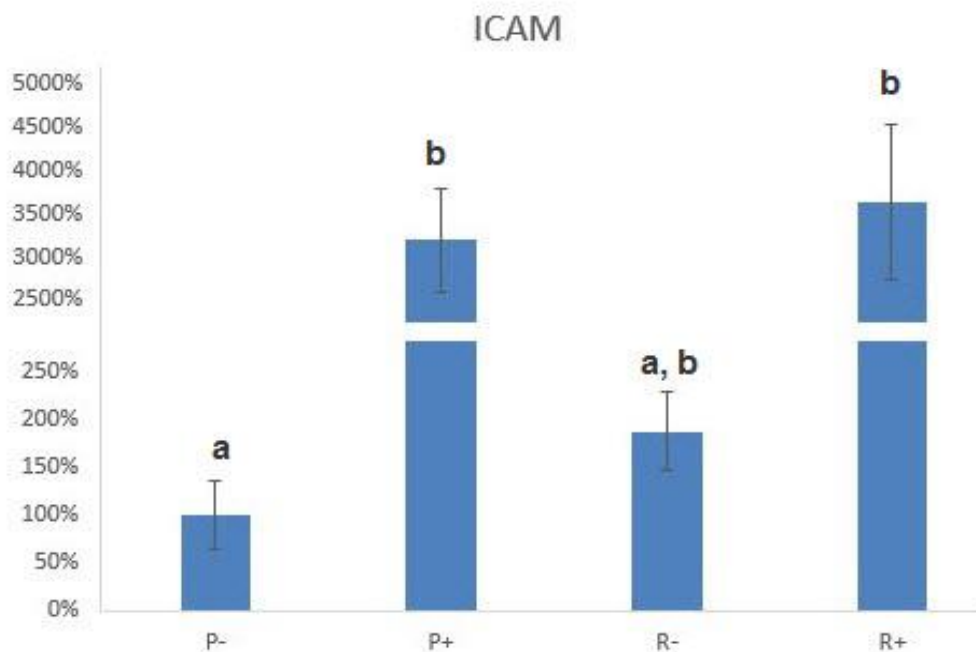
Další potvrzení, že EPA a DHA potlačují zánět, je studie prováděná na lidských monocyttech, které byly kultivovány v médiu s přidavkem EPA a DHA v poměru 3:2 (v tomto poměru jsou EPA a DHA běžně dostupné v přípravcích s rybím olejem) nebo v médiu bez jejich přidavku. Výsledkem po 48h inkubaci bylo procentuální snížení monocytů produkujících *ICAM-1*, ale i snížení exprese samotného *ICAM-1* (Hughes a Pinder, 2000). I autoři Yamada *et al.* (2008) ve své studii dokázali, že EPA inhibovala adhezi monocytů stimulovaných LPS na endoteliální buňky a zároveň i snížila množství adhezivních molekul jako *ICAM-1* v plazmě.

Už v 90. letech 20. století byly popsány příznivé účinky nenasycených MK na adhezi monocytů. Yaqoob (1998) prokázal, že dieta bohatá na MUFA snižuje adhezi periferních monocytů, zatím co Calder (1998) popsal opačný efekt u nasycených MK, kdy došlo k větší adhezenci v porovnání s PUFA. Bylo zjištěno, že monocyty ošetřené EPA mají sníženou expresi *ICAM-1*, později byl stejný efekt potvrzen i při kultivaci s DHA (Hughes a Pinder, 1997). Při použití kyseliny olejové byl efekt na monocyty přesně obrácený, docházelo k jejich shlukování a větší afinitě k endoteliálním buňkám (Mastrangelo, *et al.*, 1998).



Obr. 12 Relativní exprese genu ICAM v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší ($P < 0,05$).



Obr. 13 Relativní exprese genu ICAM v tukové tkáni.

Osa Y: Relativní exprese (P-=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší ($P < 0,05$).

5.2.5 IL-1 β

Interleukin 1 beta patří do rodiny IL-1, je to rodina 11 různých cytokinů hrající důležitou roli v imunitní a zánětlivé reakci organismu. Patří mezi pro-zánětlivé cytokiny.

Relativní exprese v játrech (Obr. 14) byla vysoce zvýšená hlavně v reakci na zánětlivý LPS. U skupin, které byly tímto lipopolysacharidem stimulovány (P+ a R+), došlo ke zvýšení ($P < 0,05$) exprese genu na 33056% u skupiny P+ a 42280% u skupiny R+. U skupiny R- došlo ke zvýšení ($P > 0,05$) exprese na 129%. Statistická významnost ($P < 0,05$) byla zjištěna mezi skupinami P-, P+ a R+, také mezi skupinami R-, P+ a R+. Mezi skupinami P- a R- prokázána nebyla ($P > 0,05$).

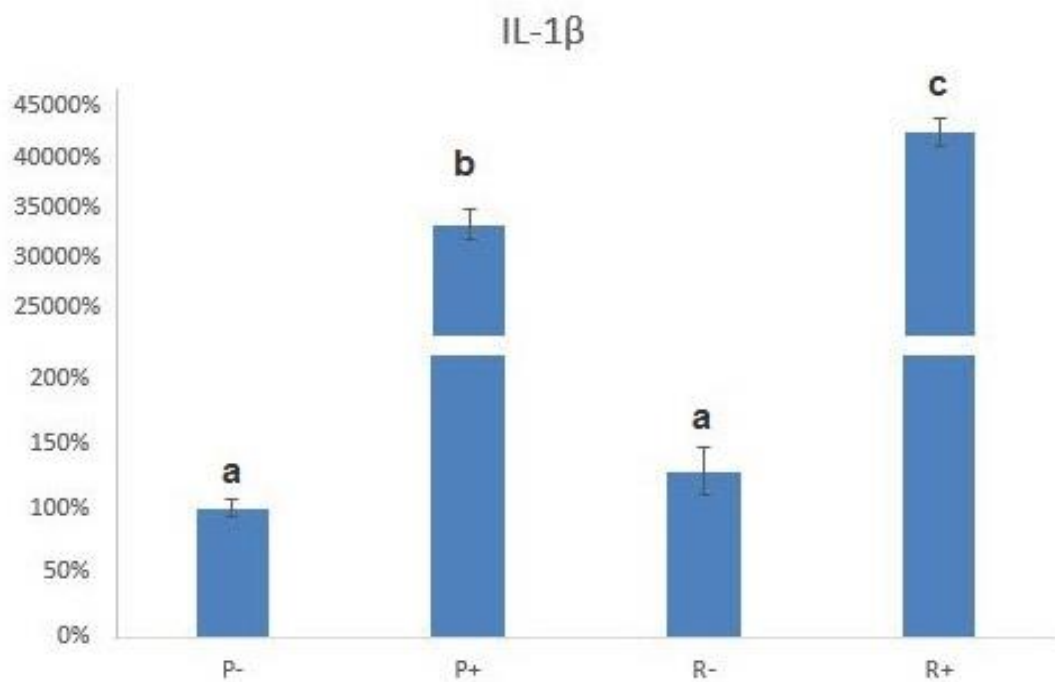
Expres v tukové tkáni (Obr. 15) oproti kontrole narostla ($P < 0,05$), ale proti játrům byl nárůst menší. U skupiny R- byl nárůst o 398%, u skupiny R+ o 31626% a u

skupiny P+ 12313%. Mezi všemi skupinami byla prokázána statistická významnost ($P < 0,05$).

Ve studii prováděné autory Oh *et al.* (2010) byl pozorován vliv diety obohacené o ω -3 MK u dvou linií myší. První linie byla tzv. wild-type, druhá měla knock-out pro gen *GPR120*. V tukové tkáni se zkoumaly makrofágy a markery M1 a M2 (výsledky M2 jsou popsány v kapitole 5.2.7). Expres M1 u zánětlivých genů jako je *Il-1 β* se zvýšila u vysoko tukové diety, a to u obou linií. Snížená exprese *Il-1 β* u diety s přídatkem ω -3 MK byla pouze u linie wild-type.

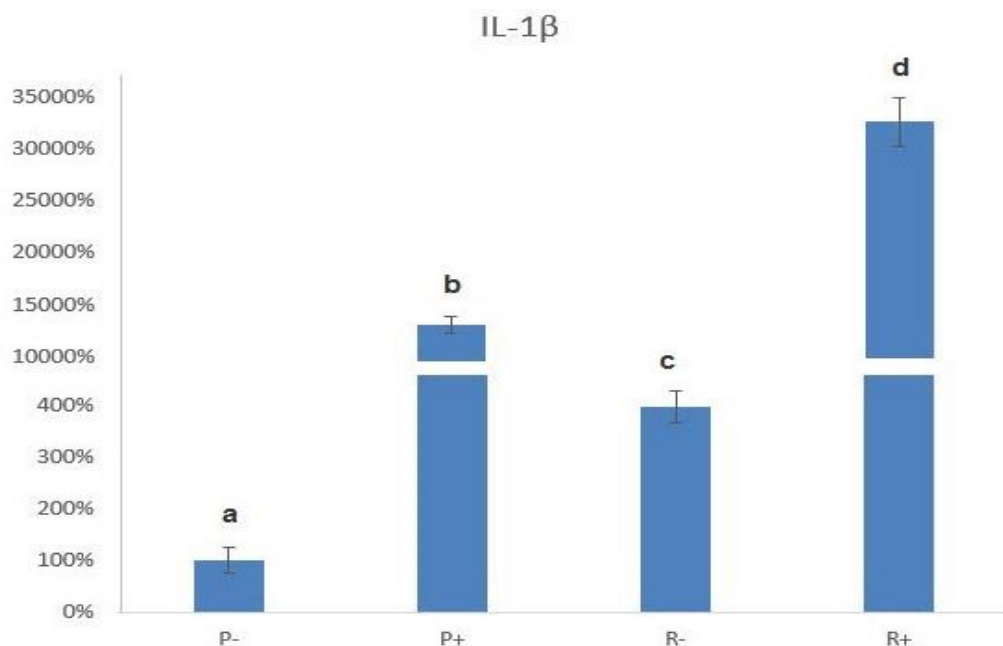
In vitro studie prováděna na dvou liniích lidských makrofágů sledovala změny sekrece *Il-1 β* po stimulaci LPS a ATP. První měla médium bez jakéhokoliv přídatku (kontrola), druhá linie měla v médiu přídatek DHA. Přidání DHA ve fyziologicky dosažitelné koncentraci vedlo k redukci sekrece *Il-1 β* . Stejný experiment byl poté proveden i u makrofágů pocházejících z kostní dřeně myší. I tady došlo ke snížení sekrece *Il-1 β* po stimulaci LPS a ATP (Williams-Bey *et al.*, 2014).

Autoři Liu *et al.* (2015) zkoumali mimo jiné i efekt rybího oleje (RO) u LPS indukovaných myší, na množství cytokinů souvisejících se zánětem. LPS byl myším aplikován peritoneálně, a proto byly zkoumány změny v tenkém střevě a plazmě. Došlo k velkému úbytku prozánětlivých cytokinů jako *Il-1 β* , a to u myší, které byly krmeny RO a zároveň stimulovány LPS. Stejnou korelaci měla i měřená mRNA (signál exprese genu *Il-1 β*), tedy její snížení u diety RO+LPS. Snížení exprese bylo vztaženo vůči expresi daných genů u myší stimulovaných LPS, které ovšem nebyly krmeny zvláštní dietou. Oproti kontrole (myši, které nebyly speciálně krmeny ani u nich nedošlo ke stimulaci LPS) totiž došlo u všech skupin ke zvýšení exprese. Bylo tedy dokázáno, že RO dokáže významně redukovat zánět.



Obr. 14 Relativní exprese genu IL-1 β v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem rybiho oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídatkem rybiho oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší (P<0,05).



Obr. 15 Relativní exprese genu IL-1 β v tukové tkáni.

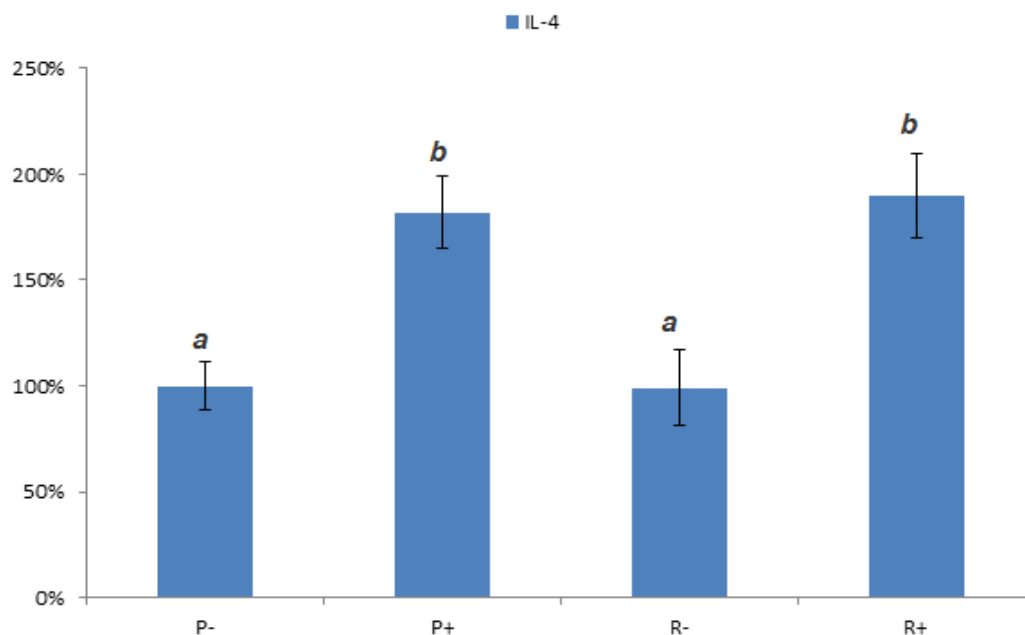
Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší (P<0,05).

5.2.6 IL-4

IL-4 indukuje diferenciaci nativních T-lymfocytů (Th0 buněk) na Th2, dále aktivují B-lymfocyty. Hraje důležitou roli v chronickém zánětu a v procesu hojení.

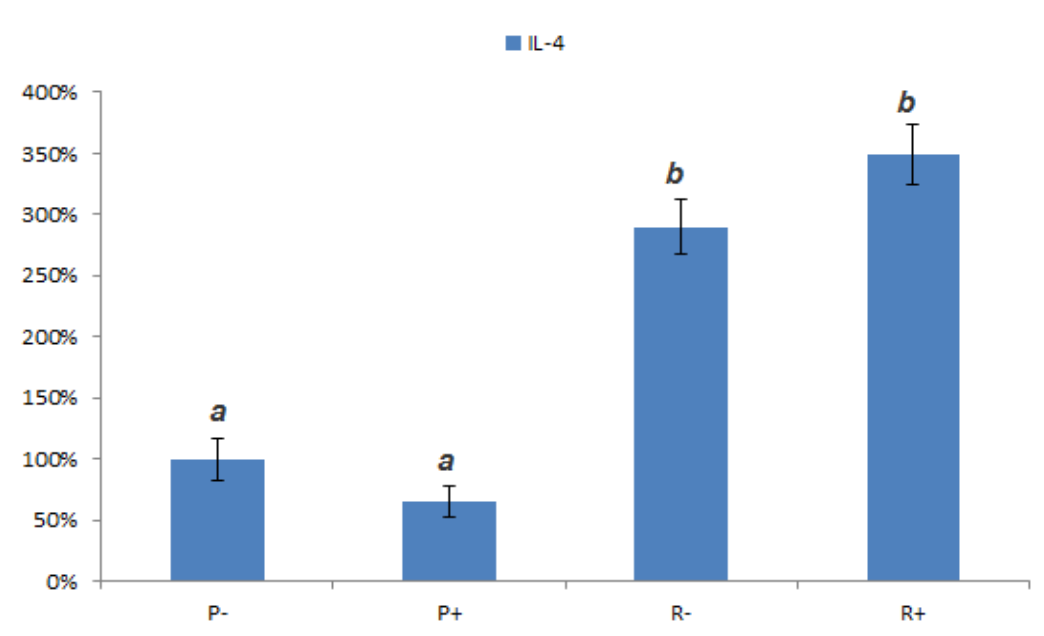
Expres v játrech (Obr. 16) byla zvýšená pouze minimální (P<0,05), u skupiny R- byla tendence ke snížení exprese (P>0,05) na 99%. U skupiny P+ byla exprese naměřena na 182% a u skupiny R+ na 190%. Statistická významnost (P<0,05) byla prokázána mezi skupinami P- a R- vs. P+ a R+.

V tukové tkáni (Obr. 17) se exprese odvíjela od druhu diety. U skupiny krmené palmovým olejem byla tendence ke snížení (P>0,05) exprese P+ na 65% oproti kontrolní skupině P-, u skupin krmených rybím olejem byla exprese naopak vyšší (P<0,05): R- 290% a R+ 349%. Statistická významnost (P<0,05) byla mezi skupinami krmenými palmovým olejem (P- a P+) a mezi skupinami krmenými rybím tukem (R- a R+).



Obr. 16 Relativní exprese genu IL-4 v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší (P<0,05).



Obr. 17 Relativní exprese genu IL-4 v tukové tkáni.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmena dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší (P<0,05).

5.2.7 IL-10

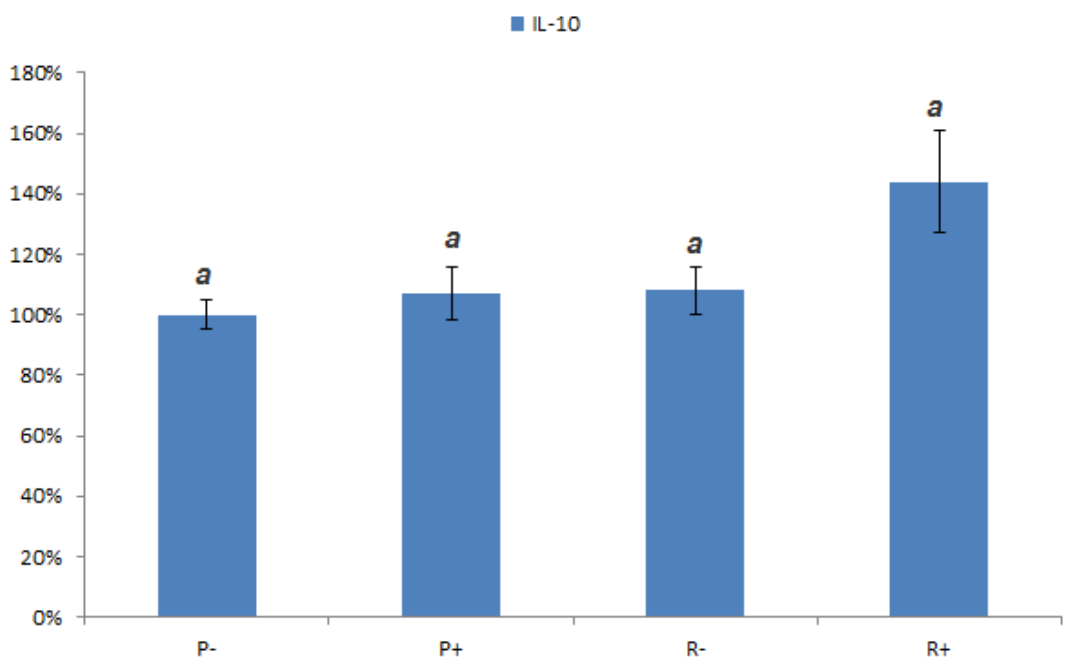
IL-10 patří mezi protizánětlivé cytokiny, má pleiotroplní efekt v imunitní odpovědi a regulaci zánětu. Snižuje expresi Th-1 cytokinů a dokáže blokovat NF- κ B.

Expresie IL-10 se v játrech (Obr. 18) od kontroly téměř nelišila, jediné u skupiny R+ byla zaznamenána zvyšující se tendence exprese na 144%, jinak se pohybovala kolo 108% jak u P+ tak i R-. Zároveň nebyla mezi skupinami určena statistická významnost ($P > 0,05$).

V tuku (Obr. 19) byl nárůst ($P < 0,05$) exprese markantnější, a to hlavně u skupin P+ (532%) a R+ (704%). Skupina R- měla nárůst ($P < 0,05$) exprese na 241%. Statistická významnost ($P < 0,05$) byla určena mezi kontrolou a ostatními skupinami (P+, R- a R+) a zároveň mezi skupinami R- a R+.

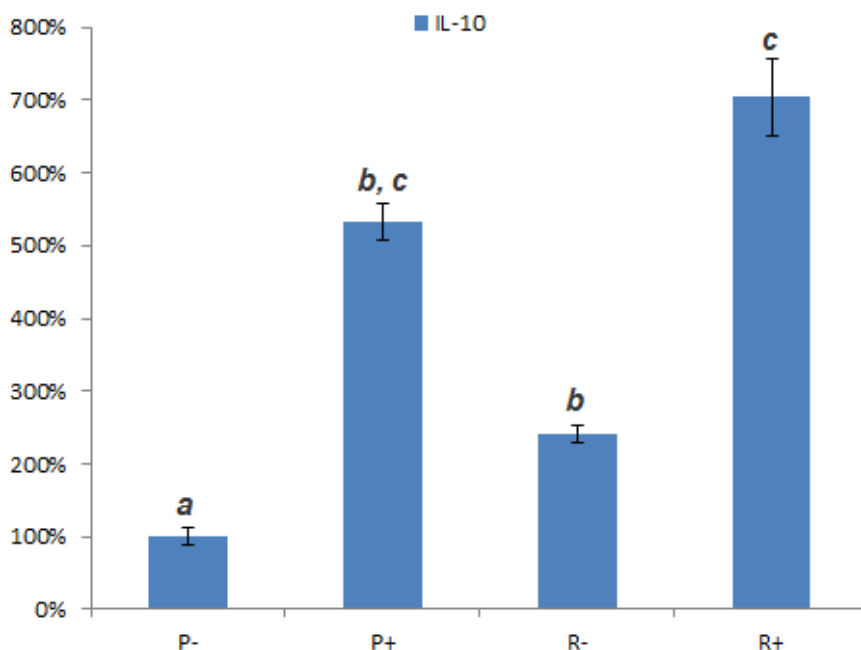
Výše popsaná studie Oh *et al.* (2010) sledovala také expresi u M2 protizánětlivých genů jako je *IL-10*. U linie wild-type myši krměných dietou obohacenou o ω -3 MK došlo ke zvýšení jejich exprese.

Autoři Monk *et al.*, (2012) ve své studii sledovali změny u imunitních buněk při zánětu tlustého střeva u obézních myši. Obezity bylo dosaženo vysoko tukovou dietou, druhá skupina byla krměna vysoko tukovou dietou s přídatkem PUFA. Hypotéza byla taková, že u myši krměných s přídatkem PUFA by mělo dojít k procentuálnímu snížení zánětlivých imunitních buněk a k potlačení exprese zánětlivých genů. V tukové tkáni došlo k potlačení exprese zánětlivých cytokinů u myši krměných přídatkem PUFA, exprese IL-10 jakožto protizánětlivého cytokinu byla zvýšená.



Obr. 18 Relativní exprese genu IL-10 v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené stejnými písmeny se průkazně neliší ($P > 0,05$).



Obr. 19 Relativní exprese genu IL-10 v tukové tkáni.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší ($P < 0,05$).

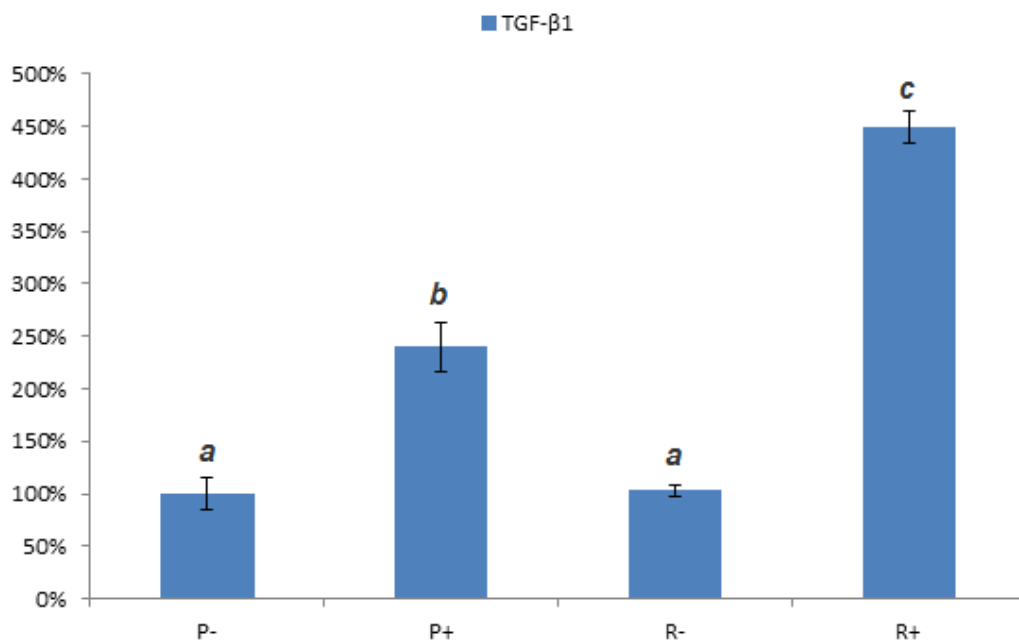
5.2.8 TGF- β 1

Jde o sekretovaný protein, který má velkou řadu funkcí od růstu a diferenciaci buněk až po apoptózu. Má také důležitou kontrolní roli v imunitním systému, je produkován téměř všemi jejími buňkami. T-buňky sekretují TGF- β 1 aby inhibovaly aktivaci jiných T-lymfocytů, u B-lymfocytů zabraňuje proliferaci a navozuje apoptózu.

V játrech (Obr. 20) byla exprese zvýšená ($P < 0,05$) pouze u skupin stimulovaných LPS, u skupiny P+ na 240% u R+ na 449%. U skupiny R- byla tendence ke zvýšení ($P > 0,05$) na 103%. Statistická významnost ($P > 0,05$) nebyla pouze mezi skupinami P- a R-.

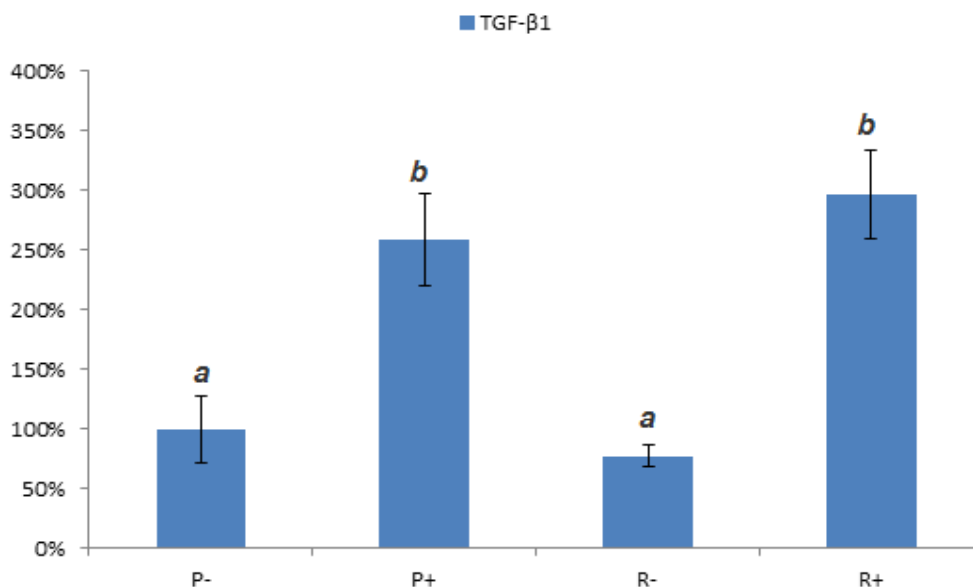
V tukové tkáni (Obr. 21) byla exprese o hodně nižší než v játrech, konkrétně u skupiny P+ 240%, R- 103% a R+ 449%. Pouze mezi skupinami bez stimulace a se stimulací LPS byla prokázána statistická významnost ($P < 0,05$).

Autoři Arita *et al.* (2005) zkoušeli, zda derivát EPY – RvE1 (protizánětlivý lipidový mediátor) dokáže ochránit střevo před zánětem. Jako modelové zvíře měli myši, u kterých indukovali zánět střeva a následně je léčili kontrolním roztokem ATLa (analog A4 lipoxinu) nebo roztokem RvE1. Myši léčené RvE1 měly významně sníženou aktivitu myeloperoxidázy, což značí zredukovaný počet leukocytů migrujících do střeva. Byla snížena exprese u prozánětlivých cytokinů jako Il-12, TNF- α a p40. Nebyl ale dokázán opačný efekt u cytokinů produkovánými T-lymfocyty jako Il-4, Il-10 a nebyla změřena změna exprese ani u TGF- β . Pozitivní účinek RvE1 byl prokázán i u histologických řezů střeva, kdy střevo myši krmených RvE1 se téměř nelišilo od kontroly (myši nijak nestimulované). U myši léčených ATLa bylo na histologickém řezu střeva nalezeno mnoho patologických změn, spojených se zánětem a s průnikem bílých krvinek do střeva.



Obr. 20 Relativní exprese genu TGF- β 1 v játrech.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší ($P < 0,05$).



Obr. 21 Relativní exprese genu TGF- β 1 v tukové tkáni.

Osa Y: Relativní exprese (P=100%). P- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, nestimulovaná LPS, P+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem palmového oleje, stimulovaná LPS, R- skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, nestimulovaná LPS, R+ skupina prasat krmená dietou s 2,5% přídavkem rybího oleje, stimulována LPS. Průměry označené různými písmeny se průkazně liší ($P < 0,05$).

6 ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabývala vlivem polynenasycených mastných kyselina na expresi vybraných genů kódující cytokiny, důležité buněčné receptory i transkripční faktory spojené se zánětem v živočišném organismu.

Jako modelový organismus sloužilo prase, konkrétně kříženec plemen České bílé ušlechtilé a Landrace. Prasata byla nakoupena v rámci projektu financovaného Interní grantovou agenturou Mendelovy univerzity v Brně. Konkrétně jsem zkoumala expresi genů *GPR120*, *PPAR γ* , *LBP*, *ICAM* a geny cytokinů *Il-4*, *Il-10*, *Il-1 β* a *TGF- β* . Exprese se lišila mezi skupinami i mezi tkáněmi, ale nenašla jsem mezi výsledky žádnou podobnost a to ani mezi protizánětlivými cytokiny, u kterých by se měla exprese měnit stejně. Například *Il-4* má v játrech u skupiny P+ zvýšenou expresi a v tuku výrazně sníženou i oproti kontrole. U všech genů se objevuje stejný trend, a to nejvyšší exprese u skupiny R+. U většiny genů potom byla exprese u skupiny R- podobná kontrole nebo jen trochu zvýšená. U genů *ICAM* a *Il-1 β* byla exprese u skupin P+ a R+ prudce zvýšená, exprese dosahovala až k 44000%. Ovšem mezi těmito skupinami už rozdíl nalezen nebyl. Nebyla tedy prokázána hypotéza, že by EPA a DHA snižovala expresi genů modulující zánět. Naopak tyto exprese byly u všech genů nejvyšší.

Doporučila bych k doplnění mých výsledků provést další experimenty, kdy bude zachovaný modelový organismus, ale bude zvýšena koncentrace EPA a DHA v krmivu nebo bude ještě více testovaných skupin, kdy se koncentrace těchto kyselin v krmivu bude postupně zvedat. Na základě výsledků jiných studií na toto téma bych také doporučila změnit v krmivu poměr EPA:DHA tak, aby DHA přesahovala EPA. Také by bylo dobré změřit expresi genů vícekrát po různých časových intervalech od stimulace LSP a zjistit, jak se tato exprese bude měnit v čase. Tyto další studie by mohly více objasnit moje výsledky, které si s hypotézou odporovaly a byly ve většině případů neprůkazné.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

ARITA M., YOSHIDA M., HONG S., TJONAHEN E., GLICKMAN J.N., PETASIS N.A., BLUMBERG R.S., SEFHAN CH.N., 2005. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *PNSA*, vol 102, 7671-7676 str. ISSN 1091-6490.

AWADA M., MEYNIER A., O SOULAGE CH., HADJI L., GÉLOËN A., VIAU M., RIBOURG L., BENOIT B., DEBARD C., GUICHARDANT M., LAGARDE M., GENOT C., MICHALSKI M.C., 2013. N-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or thiacylglycerols in mice. *Nutrition & Metabolism*. vol 10:23. ISSN 1743-7075.

BELZUNG F., RACLOT T., GROSCOLAS R., 1993. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *American Journal of Physiology*, vol 246, 111-118 str. ISSN 0002-9513.

CALDER P.C., 1998. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol 31, 467-490 str. ISSN 1414-431X.

CALDER P.C., 2004. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanism explored. *Clinical Science*, vol 107, 1-11 str. ISSN 1470-8736.

DAS U., 2006. Essential fatty acids – A review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol 7, 467-482 str. ISSN 1389-2010.

DING S.T., MERSMANN H.J., 2001. Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic protein. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, vol 12, 101-108 str. ISSN 0955-2863.

DURAN-MONTGÉ P., THEIL P.K., LAURIDSEN C., ESTEVE-GARCIA E., 2009. Dietary fat source affects metabolism of fatty acids in pigs as evaluated by altered expression of lipogenic genes in liver and adipose tissues. *Animal*, vol 3, 535–542 str. ISSN 1751-7311.

ESCHER P., BRAISSANT O., BASU-MODAK S., MICHALIK L., WAHLI W., DESVERGNE B., 2001. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*, vol 142, 4195-4202 str. ISSN 1945-7170.

EVANS R.M., BARISH G.D., WANG Y.X., 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Natural Medicine*, vol 10, 355-361 str. ISSN 1546-170X.

FERENČÍK M., 2005. Imunitní systém? Informace pro každého. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-6740-6.

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 improvement after spinal cord injury in adult rats. *Journal of Neurotrauma*, vol 29, 551-566 str. ISSN 1557-9042.

GALARRAGA B., HO M., YOUSSED H.M., HILL A., MCMAHON H., HALL C., *ET AL.*, 2008. Cod liver oil (n-3 fatty acids) as a non-steroidal anti-inflammatory drug sparing agent in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, vol 47, 665-669 str. ISSN 1462-0332.

GHOSH S., MAY M.J., KOPP E.B., 1998, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, vol 16, 225-260 str. ISSN 1545-3278.

GORJÃO R., AZEVEDO-MARTINS A.K., RODRIGUES H.G., ARCISIO-MIRANDA M., PROCOPIO J., CURI R., 2009. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacology & Therapeutics*, vol 122, 56-64 str. ISSN 0163-7258.

GROFOVÁ Z., 2007. Nutriční podpora – praktický rádce pro sestry, Praha: Grada Publishing, 227 str. ISBN 978-20-247-1868-2.

GRUNDY S.M., 2013. Factors Determining Blood Levels. In: *Encyklopedia of Human Nutrition*. 3.vydání. Academic Press, 385-391 str.

HASSANALI Z., AMETAJ B.N., FIELD C.J., PROCTOR S.D., VINE D.F., 2010. Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial

lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR-LA-cp rat. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, vol 12, 139-147str. ISSN 1463-1326.

HELLEMANS J., MORTIER G., DE PAEPE A., SPELEMAN F., VANDESOMPELE J., 2007. qBase relative quantification Framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR. *Genom Biology*, vol 8, 19-19.14 str. ISSN 1474-760X.

HIRASAWA A., TSUMAYA K., AWAJI T., KATSUMA S., ADACHI T., YAMADA M., SUGIMOTO Y., MIYAZAKI S., TSUJIMOTO G., 2005. Freefatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine*, vol 11, 90-94 str. ISSN 1078-8956.

HOLEČEK V., 2006. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin, Praha: Grada Publishing, 288 str. ISBN 80-2471-562-7.

HOŘEJŠÍ V., BARTŮŇKOVÁ J., 2005. Základy imunologie, 3. vydání, Praha: Triton, 279 str. ISBN 80-7154-686-4.

HOU L., LIAN K., YAO M., SHI Y., LU X., FANG L., HE T., JIANG L., 2012. Reduction of n-3 PUFAs, specially DHA and EPA, and enhancement of peroxisomal beta-oxidation in type 2 diabetic rat heart. *Cardiovascular Diabetology*. vol 11:126. ISSN 1475-2840.

HUGHES D.A. A PINDER A.C., 1997. N-3 polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes and inhibit antigen-presentation in vitro. *Clinical and Experimental Immunology*, vol 110, 516-523 str. ISSN 1365-2249.

HUGHES D.A. A PINDER A.C., 2000. n-3 Polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol 71, 357-360 str. ISSN 1938-3207.

ITOH Y., KAWAMATA Y., HARADA M., KOBAYASHI M., FUJII R., FUKUSUMI S., OGI K., HOSOYA M., TANAKA Y., UEJIMA H., ET AL., 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, vol 422, 173-176 str. ISSN 0028-0836.

JUMP D.B., TRIPATHY S., DEPNER CH.M., 2013. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. *Annual Review Nutrition*, vol 33, 249-269 str. ISSN 0199-9885.

KHALFOUN B., GRUEL Y., BARDOS P., LEBRANCHU Y., 1997. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human lymphocyte proliferation induced by allogenic cells. *Transplantation Proceedings*, vol 29, 2397 str. ISSN 0041-1345.

KOHAMA K., NAKAO A., TERASHIMA M., AOYAMA-ISHIKAWA M., SHIMIZU T., HARADA D., NAKAYAMA M., YAMASHITA H., FUJIWARA M., KOTANI J., 2014. Supplementation of parenteral nutrition with fish oil attenuates acute lung injury in a rat model. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol 54, 116-121 str. ISSN 1880-5086.

KOMPRDA T., 2011. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. *Journal of Functional Food*, vol 4, 25-38 str. ISSN 1756-4646.

KOMPRDA T., SLÁDEK Z., ŠKULTÉTY O., KŘÍŽKOVÁ S., ROZÍKOVÁ V., NĚMCOVÁ B., ŠUSTROVÁ T., VALOVÁ M., 2016. Effect of dietary *Schizochytrium* microalga oil on selected markers of low-grade inflammation in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol 100, 1169-1178 str. ISSN 1439-0396.

KOSTADINOVA R., WAHLI W., MICHALIK L., 2005. PPARs in disease: control mechanisms of inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, vol 12, 2413-2446 str. ISSN 0929-8673.

KRAML P., 2008. Hyperlipoproteinémie v klinické praxi. Praha: Tigris, 128 str. ISBN 987-80-903750-5-5.

LANGELIER B., ALESSANDRI J.-M., PERRUCHOT M.-H., GUESNE P., LAVIALLE M., 2005. Changes of the transcriptional and fatty acid profiles in response to n-3 fatty acids in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Lipids*, vol 40, 719-728 str. ISSN 1558-9307.

LIU Y.-H., LI X.-Y., CHEN CH.-Y., ZHANG H.-M., KANG J.X., 2015. Omega-3 fatty acid intervention suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and weight loss in mice. *Marine Drugs*, vol 13, 1026-1036 str. ISSN 1660-3397.

LOKESH B.R., BLACK J.M., GERMAN J.B., KINSELLA J.E., 1988. Docosahexaenoic acid and other dietary polyunsaturated fatty acids suppress leukotriene synthesis by mouse peritoneal macrophages. *Lipids*, vol 23, 968-972 str. ISSN 1558-9307.

LUO H.F., WIE H.K., HUANG F.R., ZHOU Z., JIANG S.W., PENG J. 2009. The effect of linseed on intramuscular fat content and adipogenesis related genes in skeletal muscle of pigs. *Lipids*, vol 44, 999–1010 str. ISSN 1558-9307.

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*, vol 8, 3-17 str. ISSN 1550-7629.

MASTRANGELO A.M., JEITNES T.M., EATON J.W., 1998. Oleic acid increases cell surface expression and activity of CD11b on human neutrophils. *Journal of Immunology*, vol 161, 4268-4275 str. ISSN 1550-6606.

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*, Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-702-8.

MAYSER P., GRIMM H., GRIMMINGER F., 2002. N-3 fatty acids in psoriasis. *British Journal of Nutrition*, vol 87, 77-82 str. ISSN 1475-2662.

MICHALIK L., AUWERX J., BERGER J.P., CHATTERJEE V.K., CLASS C.H.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*, vol 58, 726-741 str. ISSN 1521-0081.

MONK J.M., HOU T.Y., TURK H.F., WEEKS B., WU C.H., MCMURRAY D.N., CHAPKIN R.S., 2012. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) decrease obesity-associated Th17 cell-mediated inflammation during colitis. *Plos ONE*, vol 7, e49739, ISSN 1932-6203.

MURRAY R.K., GRANNER D.K., MAYES P.A., RODWELL V.W., 2002. *Harperova biochemie*. 4. vydání, Praha: H+H. ISBN 80-7319-013-3.

OH D.Y., TALUKDAR S., BAE E.J., IMAMURA T., MORINAGA H., FAN W., LI P., LU W.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*, vol 142, 687-698 str. ISSN 0092-8674.

RÉDEI G.P., 2008. Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics. 3.vydání, Springer. ISBN 978-1-4020-6753-2.

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 str. ISSN 1687-4757.

ROSEN E.D., SPIEGELMAN B.M., 2001. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 276, 37731-37734 str. ISSN 1083-351X.

RUBIN R., STRAYER D.S., RUBIN E., 2011. Rubin's pathology: Foundations of medicine. 2 vydání. ISBN 978-0-7817-9516-6.

SAMPATH H. ANANTAMBI J.M., 2006. Regulation of gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Heart and Metabolism*, vol 32, 32.35 str. ISSN 1566-0338.

SCHEFE J.H., LEHMANN K.E., BUSCHMANN I.R., UNGER T., FUNKE-KAISER H., 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concept and the novel gene expression's C_T difference" formula. *Journal of Molecule Medicine*, vol 84, 901-910 str. ISSN 1432-1440.

SCHENK S., SABERI M., OLEFSKY J.M., 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, vol 118, 2992-3002 str. ISSN 1558-8238.

SCHOELSON S.E., HERRERO L., NAAZ A., 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, vol 132, 2169-2180 str. ISSN 0016-5085.

SCHULTE G., FREDHOLM B.B., 2003. Signaling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling*, vol 15, 813-827 str. ISSN 0898-6568.

SIMOPOULOS A.P., 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 54, 438-463 str. ISSN 1938-3207.

SIMOPOULOS A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/Omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, vol. 56, 365-379 str. ISSN 0753-3322.

SNUSTAD D.P. A SIMMONS M.J., 2009. Genetika. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.

SVACHINA Š., BRETŠNAJDEROVÁ M., HOLCÁTOVÁ I., HORÁČEK J., KOVÁŘOVÁ K., KREUZBERGOVÁ J., MÜLLEROVÁ D., PEISKEROVÁ M., RYŠAVÝ Z., SULKOVÁ S., ŠMAHELOVÁ A., 2008. Klinická dietologie, Praha: Grada Publishing, 384 str. ISBN 978-80-247-2256-6.

ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., ŘUŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J., 2005. Metody molekulární biologie, Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.

TAN N.S., SHAW N.S., VINCKENBOSCH N., LIU P., YASMIN R., DESVERGNE B., WAHLI W., NOY N., 2002. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Molecular and Cellular Biology*, vol 22, 5114-5127 str. ISSN 1098-5549.

TAZOE H., OTOMO Y., KAJI I., TANAKA R., KARAKI S.I., KUWAHARA A., 2008. Roles of short-chain acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol 59, 251-262 str. ISSN 0867-5910.

TONTONOZ P., HU E., SPIEGELMAN B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by mPPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, vol 79, 1147-1156 str. ISSN 0092-8674.

VERLENGIA R., GORJAO R., KANUNFRE C.C., BORDIN S., DE LIMA T.M., MARTINS E.F., *ET AL.*, 2004a. Comparative effects of eikosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on proliferation, cytokine production, and pleiotropic gene expression in Jurkat cells. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, vol 15, 657-665 str. ISSN 0955-2863.

VERLENGIA R., GORJAO R., KANUNFRE C.C., BORDIN S., DE LIMA T.M., MARTINS E.F., *ET AL.*, 2004b. Effects of EPA and DHA on proliferation, cytokine production, and gene expression in Raji cells. *Lipids*, vol 39, 857-864 str. ISSN 1558-9307.

WANG Y., TANG Y., TENG L., WU Y., ZHAO X., PEI G., 2006. Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, vol 7, 139-147 str. ISSN 1529-2908.

WEBER T.E., KERR B.J., SPURLOCK M.E., 2008. Regulation of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α expression but not adiponectin by dietary protein in finishing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol 92, 569–577 str. ISSN 1439-0396.

WELDON S.M., MULLEN A.C., LOSCHER C.E., HURLES L.A., ROCHE H.M., 2007. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, vol 18, 250-258 str. ISSN 0955-2863.

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- κ B activation and enhancing autophagy. *Plos One*, vol 9, e97957. ISSN 1932-6203.

YAMADA H., YOSHIDA M., NAKANO Y., SUGANAMI T., SATOH N., MITA T., AZUMA K., ITOH M., YAMAMOTO Y., KAMEI Y., HORIE M., WATADA H., OGAWA Y., 2008. In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by eicosapentaenoic acid. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol 28, 2173-2179 str. ISSN 1524-4636.

YAQOUB P., 1998. Monounsaturated fats and immune function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol 31, 453-465 str. ISSN 1414-431X.

YU Y.H., LIU E.C., WU S.C., CHENG W.T.K., MERSMANN H.J., WANG P.H., DING S.T., 2008. Docosahexaenoic acid regulates adipogenic genes in myoblasts via porcine peroxisome proliferator-activated receptor α . *Journal of Animal Science*, vol 86, 3385–3392 str. ISSN 1525-3163.

YU Y.H.,WANG P.H., CHENG W.T.K., MERSMANN H.J.,WU S.C., DING S.T.,
2010. Porcine peroxisome proliferator-activated receptor d mediates the lipolytic effects
of dietary fish oil to reduce body fat deposition. *Journal of Animal Science*, vol 88,
2009–2018 str. ISSN 1525-3163.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Cis a trans konfigurace MK.	14
Obr. 2 Přehled rozdělení MK podle polohy první dvojné vazby.	17
Obr. 3 Metabolismus mastných kyselin.....	18
Obr. 4 DHA potlačuje signální dráhu NF- κ B přes transkripční faktor PPAR.	27
Obr. 5 Detekce a amplifikace RNA pomocí RT-PCR.	30
Obr. 6 Relativní exprese genu GPR120 v játrech.	38
Obr. 7 Relativní exprese genu GPR120 v tukové tkáni.	39
Obr. 8 Relativní exprese genu PPAR γ v játrech.	40
Obr. 9 Relativní exprese genu PPAR γ v tukové tkáni.	41
Obr. 10 Relativní exprese genu LBP v játrech.	43
Obr. 11 Relativní exprese genu LBP v tukové tkáni.	44
Obr. 12 Relativní exprese genu ICAM v játrech.	46
Obr. 13 Relativní exprese genu ICAM v tukové tkáni.	47
Obr. 14 Relativní exprese genu IL-1 β v játrech.	49
Obr. 15 Relativní exprese genu IL-1 β v tukové tkáni.	50
Obr. 16 Relativní exprese genu IL-4 v játrech.	51
Obr. 17 Relativní exprese genu IL-4 v tukové tkáni.	51
Obr. 18 Relativní exprese genu IL-10 v játrech.	53
Obr. 19 Relativní exprese genu IL-10 v tukové tkáni.	53
Obr. 20 Relativní exprese genu TGF- β 1 v játrech.	55
Obr. 21 Relativní exprese genu TGF- β 1 v tukové tkáni.	55

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přehled nasycených MK. Upraveno z Kraml, 2008	15
Tab. 2 Přehled nenasycených mastných kyselin.	19
Tab. 3 Množství jednotlivých MK v dietách.....	32
Tab. 4 Přehled pramerů	34