

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



Vliv rozdílných diet na hematologické a biochemické ukazatele u
laboratorního potkana

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Alena Fučíková, CSc.

Autor práce: Bc. Tereza Hudíková

2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „ Vliv krmení na hematologické a biochemické ukazatele u laboratorního potkana“ vypracovala samostatně a použila pouze pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:

.....

Tereza Hudíková

Poděkování

Chtěla bych na prvním místě poděkovat vedoucí diplomové práce doc. Ing. Aleně Fučíkové, CSc. za vedení a odbornou pomoc při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Lukáši Jebavému, CSc. za možnost spolupráce na provedeném pokusu ve Fyziologickém ústavu AV ČR. A v neposlední řadě patří mé velké děkuji rodině za morální podporu, která mi dodávala sílu.

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývala potvrzením či vyvrácením předpokladu, zda mají zvýšené dávky živočišné bílkoviny vliv na hematologické a biochemické ukazatele.

Byl vytvořen výkrmový pokus, ve kterém byli použiti laboratorní potkani kmene Wistar, shodného pohlaví (samci) a jednotného věku při narození (+/- 5 dnů). Potkani byli rozděleni do 3 skupin po 10 kusech. Věk při zahájení pokusu byl cca 62 dní. Skupina č. 1 byla krmena standardní jadrnou směsí ad libitum, skupina č. 2 byla krmena standardní jadrnou směsí (6 g) s homogenizovaným hovězím masem (10 g), jehož množství odpovídá obsahu dusíkatých látek standardní jadrné směsi. Skupina č. 3 byla krmena ad libitum homogenizovaným hovězím masem.

Před zahájením pokusu byl proveden odběr krve z kolaterální ocasní žíly, po ukončení pokusu byl proveden odběr krve punkcí ze srdce in vivo. Krevní vzorky z odběrů před a po pokusu byly použity pro analýzu hematologických a biochemických parametrů. Pro hematologické vyšetření byla použita krev ošetřena EDTA a pro stanovení biochemických ukazatelů byla použita krevní plazma. Celkově byly stanoveny tyto ukazatele: počet erytrocytů, hematokrit, hemoglobin a MCV u hematologické analýzy, triacylglycerol, cholesterol, kys. močová, dále prvky hořčík a železo u biochemické analýzy.

Byly zjištěné statisticky významné rozdíly mezi hodnotami před a po pokusu u počtu erytrocytů, hemoglobinu a MCV z hematologických ukazatelů, tak u cholesterolu, hořčíku a železa z biochemických ukazatelů. Výsledky tohoto pokusu ukazují, že příjem odlišné diety může mít vliv na hematologické a biochemické ukazatele.

Klíčová slova: potkan, diety, hematologie, biochemie

Summary

This thesis aims to investigate the relationship between increased protein dosage intake and selected haematological and biochemical markers.

An experiment was designed using the Wistar laboratory rats of the male gender and similar age (born within +/- 5 days). These specimens were then divided into 3 groups with 10 specimens each. The age of the specimens at the beginning of the experiment was around 62 days. The first group was fed the standard corny mixture ad libitum, while the second group received 6 grams of the standard corny mixture and 10 grams of beef meat per day (thus reflecting the same amount of nitrous compounds as for the first group) and the last (third) group was fed ad libitum with homogenised beef meat.

Before the diet was imposed on the three groups, blood samples were collected from all specimens from the lateral tail vein; after the diet was completed, blood samples were collected by in vivo heart puncture. All blood samples were subjected to haematological (using EDTA blood) and biochemical (using blood plasma) analysis. Overall, the following markers were measured: amount of erythrocytes, haematocrit level, haemoglobin level and Mean Corpuscular Volume (MCV) for the haematological analysis and triacylglycerol level, cholesterol level, amount of urea, amount of magnesium and the amount of iron for the biochemical analysis.

Dietary induced significant changes were observed for the following markers: number of erythrocytes, levels of haemoglobin and MCV from the haematological analysis and cholesterol levels, amount of magnesium and amount of iron from the biochemical analysis; therefore showing that altered diet can have affect haematological and biochemical blood markers.

Keywords: rat, diet, haematology, biochemistry

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíl práce.....	9
3	Literární rešerše.....	10
3.1	Laboratorní potkan.....	10
3.1.1	Původ laboratorního potkana a jeho etologie.....	10
3.1.2	Souhrn základních fyziologických hodnot laboratorního potkana.....	13
3.1.3	Kmeny laboratorních potkanů.....	14
3.2	Hematologie.....	17
3.2.1	Způsoby odběru krve u potkanů.....	17
3.2.2	Složení potkaní krve.....	18
3.2.2.1	Erytrocyty.....	19
3.2.2.2	Leukocyty.....	21
3.2.2.3	Trombocyty.....	23
3.2.3	Obecné srovnání hematologických dat vybraných autorů.....	23
3.3	Biochemie.....	24
3.3.1	Triacylglycerol (TAG).....	24
3.3.2	Cholesterol.....	25
3.3.3	Kyselina močová.....	26
3.3.4	Hořčík (Mg).....	26
3.3.5	Železo (Fe).....	27
4	Materiál a Metody.....	29
4.1	Materiál.....	29
4.1.1	Laboratorní potkani použítí v experimentu.....	29
4.1.2	Složení krmných dávek.....	29
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	32
4.2	Metodika.....	33
4.2.1	Metody stanovení hematologických ukazatelů.....	33
4.2.2	Metody stanovení biochemických ukazatelů.....	33
4.2.3	Statistické zpracování dat.....	39
5	Výsledky.....	40

5.1	Hematologické ukazatele.....	40
5.1.1	Statistické vyhodnocení hematologických dat.....	40
5.1.2	Erytrocyty.....	43
5.1.3	Hematokrit.....	44
5.1.4	Hemoglobin.....	45
5.1.5	MCV.....	46
5.2	Biochemické ukazatele.....	47
5.2.1	Statistické vyhodnocení biochemických dat.....	47
5.2.2	Triacylglycerol.....	49
5.2.3	Cholesterol.....	50
5.2.4	Kyselina močová.....	51
5.2.5	Hořčík.....	52
5.2.6	Železo.....	53
6	Diskuze.....	54
6.1	Hematologické ukazatele.....	54
6.2	Biochemické ukazatele.....	57
7	Závěr.....	63
8	Použitá literatura.....	65
9	Seznam zkratk a symbolů.....	71
10	Přílohy.....	72

1 Úvod

Výživa a vlastní složení diety je velice důležitý parametr pro fyziologický chod organismu. Každý živočišný druh má své specifické výživové nároky, které, pokud se dodržují, zajišťují zdraví jedince, jeho obranyschopnost, regulaci a tvorbu tepla, správnou funkci metabolismu aj. Živočichové, ale i člověk, přijímají organické a anorganické látky nezbytné pro svůj život z vnějšího prostředí. Pokud je dieta upravena či pozměněna záměrně nebo přirozeně vlivem nedostatku/nadbytku, může dojít ke sledu poruch ve funkci organismu, dochází ke vzniku mnoha různých chorob a celkově se např. nedostatek určitých látek může projevit také neplodností jedince. Proto je důležité, aby se dodržovalo výživové doporučení u jakéhokoli organismu, aby nedocházelo k dlouhodobému deficitu životně důležitých látek.

Do dnešní doby bylo provedeno mnoho studií založených na výkrmovém pokusu, kdy testovaná skupina byla krmena odlišnou dietou oproti skupině kontrolní. Následně se posuzují hematologické ukazatele nebo se stanovují biochemické parametry ať už z krve či také ve svalovině a tuku. Tento pokus byl založen na podobném principu podávání odlišných diet, konkrétně mono – dietě hovězího masa u potkanů. Provedly se hematologické a biochemické stanovení předem daných ukazatelů a veškerá získaná data byla vyhodnocena statistickou analýzou.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo sledování výkrmového pokusu prováděného na laboratorních potkanech kmene Wistar při podávání různých dávek hovězího masa. Následně byly laboratorně a statisticky vyhodnoceny hematologické a biochemické parametry z odebraných krevních vzorků.

Hypotéza je založena na předpokladu, že zvýšené dávky živočišné bílkoviny ovlivní hematologické a biochemické ukazatele.

3 Literární rešerše

3.1 Laboratorní potkan

Potkan obecný, *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), je jeden z mnoha zástupců reprezentující čeleď *Muridae*. Tento drobný synantropní savec je velice úspěšným kolonizátorem. Je považován za silně sociální druh, svou přizpůsobivostí a vazbou na člověka mu i lehce konkuruje, obývá-li stejné biomy (konzumace a kontaminace uskladněných potravin, přenos parazitů, škody na majetku).

3.1.1 Původ laboratorního potkana a jeho etologie

Laboratorní potkan (bílá i jiná zbarvená forma) pochází z kosmopolitně rozšířeného potkana obecného (Zejda et al., 2002). Jeho taxonomické členění je následující viz Tab. 1. Původem pochází z Východní Asie, z bažinných oblastí mírného pásma Sibiře a Číny, odkud se zejména pasivně začal šířit směrem na západ. Jak uvádí Steinbach (1999), nejstarší zprávy o výskytu potkanů v Evropě pochází z 10. století z hradu Scharnstorf v Holštýnsku. Tento hlodavec je i v historických zprávách a písemnostech vždy spojen s pohromami a vážnými onemocněními, jako přítomnost v obilných sýpkách, morové epidemie, aj. (Steinbach, 1999; Zejda et al., 2002).

Výskyt potkanů ve volné přírodě je v rákosí a mokřadech u potoků, u polí a výjimečně v listnatých lesích. Velmi dobře znají svá území a nedůvěřivě přijímají jakékoli změny, proto je zachycení do pastí velmi obtížné. Jsou vysoce inteligentní a vše neznámé podrobí důkladnému zkoumání. Když se vyskytne nový zdroj potravy, je vyslán tzv. ochutnávač. Členové vyčkají, a pokud se projeví nežádoucí účinky popřípadě smrt, ostatní jedinci tento zdroj potravy již nevyužijí. Potravní spektrum hlodavců je obecně pestré a dá se říci, že pokud se nejedná o druhy úzce potravně specializované, jsou schopni zkonzumovat téměř cokoli (Velenská, 2007). Denní příjem u potkanů zahrnuje jak rostlinnou, tak živočišnou složku. Akceptují jakékoli příležitosti od krmiv a osiv pro hospodářská zvířata až po odpadkové zbytky na smetištích. Jsou vynikajícími plavci a chytají si malé ryby, raky a

nepohrdnou ani vodním hmyzem. Škodí na hnízdech vodního ptactva, drůbeže a dokážou z nedostatku potravy napadat drobné savce až do velikosti králíka (Anděra et Horáček, 2005; Zejda et al., 2002).

Charakteristickým způsobem života je shlukování se do společenstev. Mnoho autorů popisuje výskyt v rodinách nebo jinak řečeno v rodinných klanech, což jak uvádí Steinbach (1999) z nich činí silné protivníky, a proto se potkani daleko méně než myši stávají kořistí domácích koček. Jsou velmi ostražití, v nebezpečí agresivní a dokážou se vrhnout i proti silnějšímu útočníkovi. Hnízdí v různých úkrytech a při shánění potravy se od svého hnízda vzdalují 100 m a často i dále (Steinbach, 1999; Pelikán et al., 1979). Mnoho autorů se shoduje, že aktivita je vysoká zejména v noci a k ránu. Ovšem Figala (1965) se zmiňuje, že aktivita podléhá společenskému postavení, kdy před západem, kolem půlnoci a po východu slunce jsou aktivní hlavně mladí, nedospělí jedinci, tedy z nižšího stupně společenského zařazení.

Kolonie potkanů se skládá z navzájem příbuzných jedinců, kde základem je rodičovský pár nebo březí samice (Anděra et Horáček, 2005). V rodinách fungují složité společenské vztahy, které jsou hierarchicky odstupňované, postavení v klanu není tedy rovnocenné, natož pak mezi ostatními koloniemi. Proto se lze setkat s dominantními a submisivními koloniemi (Vlasák, 2006). Počet členů, zejména samců, je přímo úměrná populační hustotě prostředí. Je-li na nízké úrovni, skládá se každá skupina z dominantního samce a samic s mláďaty. Je-li populační hustota prostředí příliš vysoká, vznikají společenstva s větším zastoupením samců rozdílného sociálního postavení, doplněné o samice a mláďata (Vlasák, 2006; Anděra et Horáček, 2005). Ovšem současně mnoho analýz zjistilo, že u nejstarších jedinců je poměr pohlaví ve prospěch samic (Zejda et al., 2002). Jednotliví členové se navzájem poznávají čichem a útočí na neznámé jedince a konkurenční smečky. Území jsou pečlivě střežena a pochybují se po pachem vyznačených chodnících (Pelikán et al., 1979). Dorozumívají se kromě čichu také hlasovým projevem na ultrazvukové úrovni. Frekvence je dle hierarchického postavení. Podřazený či poražený jedinec používá vlnovou délku 22 kHz. Dominantní samec využívá frekvenci 40 – 70 kHz. Vzájemná komunikace je doplněna o postoj těla (Velenská, 2007).

Úspěšnou strategií u potkanů je vlastní rozmnožování. Vysoká rychlost množení udržuje populační hustotu. I zde pro zachování kvalitní populace funguje sociální hierarchie, kdy se slabí, stresovaní jedinci nezapojují (Velenská, 2007; Anděra et Horáček, 2005). V populaci je trvale přibližně 30 % samic gravidních a mohou mít během roku 3 – 5 vrhů. Rodí se 6 – 10 holých a slepých mláďat, která se stávají po 3 měsících pohlavně dospělá. Samice může opět zabřeznout do 14 hodin po porodu a většinou se tak i stává (Anděra et Horáček, 2005; Pelikán et al., 1979).

Tab. 1 Taxonomické zařazení *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)

Říše	<i>Animalia</i>
Kmen	<i>Chordata</i>
Podkmen	<i>Vertebrata</i>
Třída	<i>Mammalia</i>
Podtřída	<i>Theria</i>
Řád	<i>Rodentia</i>
Podřád	<i>Myomorpha</i>
Čeleď	<i>Muridae</i>
Podčeleď	<i>Murinae</i>
Rod	<i>Rattus</i>
Druh	<i>Rattus norvegicus</i>
Poddruh	<i>Rattus norvegicus norvegicus</i>

(Biolib.cz; online 4.2. 2015)

3.1.2 Souhrn základních fyziologických hodnot laboratorního potkana

Délka života	3 – 4 roky
Hmotnost těla -porodní	5 – 6 g
-při odstavu	35 – 50 g
dosp. -samec	450 – 520 g
-samice	250 – 300 g
Délka těla	180 – 250 mm
Délka ocasu	160 – 205 mm (kratší než tělo)

Obecně lze potkana řadit mezi větší hlodavce, jelikož jeho zadní tlapka má často rozměry více jak 40 mm.

Počet chromozomů	42
Tělesná teplota (rektální)	36 – 40 °C
Tep	250 – 450 /min
Dech	70 – 115 /min
Systolický tlak	84 – 134 mm Hg
Diastolický tlak	60 mm Hg
Pohlavní dospělost samec	6. – 8. týden
samice	5. – 8. týden
Sestup varlat	22. – 30. den
Použití k plemenitbě	65. – 110. den

Říjový cyklus	4 – 5 dní
Estrus	9 – 20 hod
Gravidita	20 – 23 dní
Počet mláďat ve vrhu	6 – 12
Počet vrhů za rok	7 – 9
Odstav mláďat	21. den

Jak uvádí Zejda et al. (2002), v těle samic žijících v kanalizační síti, bylo zjištěno v průměru 5 embryí a u samic mimo tuto síť 7 embryí.

Objem žaludku	11 – 16 ml
Spotřeba krmiva za den	5 – 10 g/100 g ž. hm.
Spotřeba vody za den	8 – 11 ml/100 g ž. hm.
Produkce moči	11 – 15 ml/den
Produkce trusu	9 – 15 g/den

(Jebavý et al., 2011; Kendíková et Vítková, 2004; Knotková et Knotek, 2000; Zejda et al., 2002; Wolfensohn et Lloyd, 2003)

3.1.3 Kmeny laboratorních potkanů

Potkani jsou v dnešní době hojně využíváni jako laboratorní zvířata ve výzkumech v lékařské, veterinární či zemědělské oblasti. Ale ne vždy je tento hlodavec vhodný. Jak uvádí Jebavý et al. (2011), potkani se příliš nehodí pro práci v mikrobiologii či imunologii vzhledem ke značné odolnosti vůči řadě infekčních nemocí.

Jak píše Šilhavý (2006), po roce 1880 byly první chovné pokusy se snahou získat homogenní populaci. Dále popisuje, že v roce 1900 byl na univerzitě v Chicagu zahájen chov albinotických potkanů a následně na něj v roce 1906 navazoval Wistar Institute v USA. Jebavý et al. (2011) doplňuje, že díky tomuto systematickému chovu byl vytvořen první inbrední kmen – Wistar Albino. Tento kmen byl hlavním zdrojem laboratorních kolonií na celém světě. Rodokmen (W) přispěl ke vzniku mnoha dalších kmenů. Byl z něj odvozen například v roce 1924 další albinotický kmen Sprague – Dawley, křížením samic kmene Wistar s hybridními samci neznámého původu, nebo byl vytvořen barevný kmen Long – Evans, který vznikl již v roce 1915 křížením samic kmene Wistar se samci divokých potkanů. Jednotlivé kmeny lze tedy rozdělit do dvou skupin na albinotické a barevné. Mezi albinotické kmeny patří Wistar (W), Lewis, Sprague – Dawley (SD), Osborne Mendel (OM), Fisher (F344) aj. Mezi barevné kmeny řadíme např. již zmíněný Long – Evans (LE), který je černý, černobílý nebo aguti, či strakatý Sherman (SH) (Šilhavý, 2006; Jebavý et al., 2011; Pass et Freeth, 1993).

Kmeny potkanů lze rozdělit na dvě skupiny: inbrední a outbrední kmeny. Outbrední kmen je složen z jedinců, kteří mají mezi sebou v generaci méně než 1 % příbuznosti (Živná, 2001). Je to chovná skupina geneticky heterogenních jedinců, obvykle vedena jako uzavřená kolonie bez zavedení jedinců z jiných kmenů. Jsou geneticky jedineční, tudíž odlišní od ostatních a zároveň mohou nést některé společné znaky/rysy, jako například kmen Wistar (Hau et Schapiro, 2011; Bienertová Vašků et al., 2007).

Inbrední kmen vzniká produkcí 20 a více generačním pářením bratr x sestra. Účinek tohoto páření je zvýšit homozygotnost ve kmeni. Alternativní varianta je páření rodiče x potomstvo, za předpokladu páření vždy mladšího z obou rodičů (Hau et Schapiro, 2011).

Další variantou je rekombinantně inbrední kmen (RI), který vzniká z 2 standardních inbredních kmenů, je vytvořena F1 generace hybridů, z této F1 populace následuje páření bratr x sestra, vznik F2 populace, po dobu nejméně 20 generací (Hau et Schapiro, 2011).

Kongenní kmen vzniká opakovaným (min 12x) zpětným křížením inbredních kmenů. O dvou kongenních kmenech hovoříme tehdy, liší – li se v určitém lokusu a přilehlé malé části chromozomu (Bienertová Vašků et al., 2007).

Bienertová Vašků et al. (2007) tvrdí, že koisogenní kmeny jsou tehdy, pokud se navzájem liší v jediném lokusu jako následek bodové mutace v diferenčním lokusu.

Mutantní kmen je ten kmen nesoucí definovanou mutaci, např. v genomu. Takové kmeny lze získat tzv. knock-out technologií. Mutace může mít patologickou povahu a daný jedinec většinou slouží jako biomodel (Bienertová Vašků et al., 2007).

Transgenní kmen vzniká vnešením syntetického, modifikovaného či jinak cizorodého genu do genomu definovaného kmene (Smustad et Simmons, 2009).

Podle Bienertové Vašků et al. (2007) lze rozdělit laboratorní zvířata z hlediska mikrobiálního osídlení, respektive dle přítomnosti či nepřítomnosti patogenních zárodků, na:

- Konvenční jedince - chována v „otevřených“ zařízeních bez bariéry; mikrobiální osídlení neznámé
- SPF jedince – specified pathogen free; zvířata za bariérou (izolátor); jedinci úmyslně osídleni definovanou mikroflórou
- Gnotobiologické jedince – získaná hysterektomií; chov bezmikrobně v izolátoru; technologie chovu prokazatelně prostá všech jiných forem života či záměrně osídlena jedním i více mikroorganismy.

3.2 Hematologie

Hematologie je klinicko – laboratorní obor, který napomáhá při diagnostice. S krví, jakožto biologickým materiálem, se musí pracovat dle určitých zásad. Vlastní odběr krve může být ovlivněn dobou odběru (po krmení vs. při lačnění), typem odběrových zkumavek, technikou odběru či polohou odebíraného jedince (Zima et al., 2013).

3.2.1 Způsoby odběru krve u potkanů

Každé laboratorní zvíře má svá vhodná místa pro odběr krve. U potkana tomu není jinak. Jak publikoval kupříkladu Nejedlý (1967), pokud odebíráme pouze malé množství krve, lze provést odstřižením konce ocasu. Také ale uvádí, že častou nevýhodou je následné ohlodávání si rány. Tomuto tématu se pochopitelně věnovalo mnoho autorů a základní popis k jednotlivým odběrům bude následovat v této kapitole. Je nutné ovšem zmínit, že u všech technik odběru krve je důležitý proškolený personál, odborné znalosti a dovednost získat požadované množství krve bez zbytečného strádání, stresu a zranění zvířat (Moore, 1995).

Jednou z prvních možností odběru krve u potkana je z očníkové žilní pleteně, což vyžaduje značné zkušenosti. Tato metoda je méně riskantní, ale pokud se provádí nesprávně, může vést k poruše krevního zásobení oka s následnou slepotou nebo atrofií oka. Je-li potřeba více vzorků, měly by být odebírané střídavě, tedy každý odběr z opačné očníce a ne častěji než jednou za 5 – 7 dní z každého oka (Moore, 1995).

Druhou často používanou odběrovou technikou je srdeční punkce. Zvířeti by při této metodě mělo být podáno anestetikum buď injekčně, nebo inhalačně. Plynové anestetikum (halotan, izofluran, aj.) je pro tuto metodu výhodnější, jelikož po injekčních činidlech je delší doba zotavení, ovlivňují metabolismus a spotřebu krmiva. Plynová anestezie je krátkodobě působící a zvíře vyjmuté z komory se rychle probudí z narkózy, zhruba během 20ti sekund. Punkce srdce je prováděna tak, že se na hrudníku nahmatá místo, kde je nejsilněji cítit tep nebo se odpočítá místo mezi 3. – 5. žebrem na levé straně a zde je aplikována jehla přímo do

srdce. Při této metodě je ovšem zvýšené riziko protržení plíce s následným pneumotoraxem (Moore, 1995; Moore, 2000).

Jiná alternativní místa pro odběr krve u potkanů jsou přední dutá žíla, krční žíla, vena saphena (povrchová podkožní žíla dolní končetiny; **velká s.** probíhá po vnitřní straně končetiny až k tříslu, **malá s.** vede po zadní straně lýtky do podkolenní jamky), boční ocasní žíla a hřbetní nártní žíla (Archer et Riley, 1981; Conybeare et al., 1988; Moore, 1995). Při odběru z ocasní žíly se musí ocas potkana zahřát a to vložením ocasu do teplé vody, použitím teplého obkladu či zahřátí celého jedince, kdy se vloží potkan do vyhřáté komory na 40 °C po dobu 10 – 15 min. Tyto přípravy usnadní vasodilataci a následný odběr krve (Moore, 1995).

Při odběru velkého množství smíšené (venózní a arteriální) krve lze potkany stít pomocí gilotiny. Zde se doporučuje podání sedativ vždy, pokud je to možné, jelikož je potkan fixován u lopatek a technik má prsty příliš blízko gilotiny a hrozí tak zranění technika (Andrews et al., 1993).

Další neméně důležitou částí odběru krve, je vhodné množství vzorku. U některých laboratorních diagnostik je stanoveno minimální množství krve, u některých experimentů je přímo součástí metodiky, zda dojde při odběru k usmrcení jedince, nebo zůstane naživu pro pokračování pokusu. Například autoři Mitruka et Rawnsley (1981) stanovili vhodné a bezpečné množství přibližně 5,5 ml krve/1 kg ž. hm. v průběhu jednoho odběru. Množstvím odebrané krve u potkana se také zabýval Scipioni et al. (1997), který také uvádí, že lze odebrat až 40 % objemu krve. Toto tvrzení demonstroval u 13 po sobě jdoucích odběrech, každý po 24 hod, a tvrdí, že toto množství nevedlo ke zvýšené nemocnosti či úmrtnosti, nebyla ovlivněna tělesná hmotnost a hematologické hodnoty se vrátily do normálního stavu během dvou týdnů po odběru.

3.2.2 Složení potkaní krve

Krev se podílí na udržování stálosti vnitřního prostředí. U obratlovců je v uzavřeném krevním oběhu a zajišťuje propojení všech orgánů humorálního řízení. Obecně se skládá z krevních buněk a z krevní plazmy. Toto složení krve umožňuje podílet se na přenosu kyslíku

a oxidu uhličitého, na transportu látek (živiny, vitamíny, hormony, ad.), na obranyschopnosti proti nežádoucím mikroorganismům a toxinům, na termoregulaci jedince a napomáhá regulovat pH, vodu, osmotický a krevní tlak. Pro své charakteristické složení lze brát krev jako významné kritérium pro posouzení fyziologického/patologického stavu organismu (Jelínek et Koudela, 2003). U savců množství krve kolísá dle druhu. Podle Argent et al. (1994) je u potkana objem krve stanoven na $7,20 \pm 0,19$ ml/100 g ž. hm. nebo jsou uváděna rozmezí jako v případě Wolfensohn et Lloyd (2003), jejichž objem krve se pohybuje mezi 5,4 – 7,0 ml/100 g ž. hm.

3.2.2.1 Erytrocyty

Hlavní funkcí erytrocytů je transport kyslíku a oxidu uhličitého. Vlastní velikost a tvar zvyšuje povrch buňky, což usnadňuje přestup plynů. Průchod červených krvinek kapilární sítí je umožněn elasticitou membrán (Jelínek et Koudela, 2003). Erytrocyty potkanů jsou bikonkávní disky s průměrem 6,2 μm , udává se rozmezí 5,7 – 7,0 μm (Schermer, 1967; Doubek et al., 2003). Autoři Nejedlý (1967) a Schermer (1967) se shodují v často se vyskytující anizocytóze. Oba popisují, že tento jev je výrazný a běžný, zejména s větší variabilitou ve velikosti než ve tvaru a průměr některých buněk může být \pm o 1/3 větší nebo menší od průměrné velikosti. Také Godwin (1964) se anizocytózou zabýval a tvrdí, že u nemocných potkanů je ještě více viditelná. Počet erytrocytů podle Nejedlého (1967) není výrazně ovlivněn věkem, pohlavím či vlivem potravy. Ovšem toto tvrzení vyvrací Mitruka et Rawnsley (1981), kteří uvádí, že počet erytrocytů se věkem ovlivní, jelikož teprve až ve 4. měsíci dosáhne počet červených krvinek dospělé úrovně. A také se zmiňují i o ovlivnění pohlavím, kdy samci mají počet erytrocytů vyšší než samice. V krvi jsou také přítomny polychromatofilní erytrocyty, a to v rozmezí 1 – 18 % z celkového počtu červených krvinek (Mitruka et Rawnsley, 1981; Doubek et al., 2003). Počet retikulocytů představuje 2 – 5 % u dospělých jedinců a 10 – 20 % u mladých potkanů (Schermer, 1967). Polychromatofilní buňky mají šedavé zabarvení a oproti erytrocytu neobsahují celou dávku hemoglobinu (Moore, 1995). Po opotřebením erytrocytů dochází k jejich zániku, a to konkrétně k zadržení ve slezině,

v játrech či kostní dřeni (Jelínek et Koudela, 2003). Životnost erytrocytů je u potkanů 45 – 68 dní (Harkness et Wagner, 1995).

Hemoglobin (Hb)

Hemoglobin je červené barvivo a tzv. funkční složka erytrocytu. Tato molekula je složena z hemu, v němž se váže dvojmocné železo, a z bílkovinné/ globinové složky. Hlavní funkcí Hb je přenos kyslíku z plic do tkání, kdy se molekula kyslíku naváže na subjednotky hemu. Tento proces se nazývá oxygenace a vzniká derivát oxyhemoglobin, z něhož se kyslík může ve tkáni opět uvolnit (Jelínek et Koudela, 2003). Jak uvádí Ringler et Dabich (1979), hladina hemoglobinu se u potkanů odlišuje podle zařazení do inbredních nebo outbredních kmenů, dále je ovlivněna věkem a zdravotním stavem. Také pohlaví hraje velkou roli, jelikož u samců je Hb vyšší než u samic. Mitruka et Rawnsley (1981) stanovují hladinu Hb u samců v rozmezí 13,4 – 15,8 g/100 ml (průměr 14,6 g/100ml) a hladinu Hb u samic v rozmezí 11,5 – 16,1 g/100 ml (průměr 13,8 g/100ml).

Hematokrit (Ht)

Hematokrit je označován také jako hematokritová hodnota, která vypovídá o podílu erytrocytů z celkového objemu krve (Jelínek et Koudela, 2003). Stanovuje se centrifugací při kontrole krevního obrazu a při diagnostikování mnoha onemocnění, mezi které patří např. anémie (Zima et al., 2013). Sloupec červených krvinek je nahromaděn ve zkumavce dole a je označován jako PCV (Packed Cell Volume). Nad nimi se vyskytuje vrstva leukocytů a trombocytů jako menší bělavá vrstva, nejvýše je krevní plazma (Reece, 1998). Hodnota hematokritu u potkana je v rozmezí 39 – 54 % (Ringler et Dabich, 1979).

Střední (průměrný) objem erytrocytu (MCV)

MCV (Mean Cell Volume) je zprůměrovaná hodnota objemu jednotlivých krvinek, tedy Ht, proti počtu červených krvinek ve vzorku, viz vzorec (Zima et al., 2013).

$$\text{MCV [fl]} = \frac{\text{Ht}}{\text{počet Er (l)}}$$

Střední (průměrná) hmotnost Hb v erytrocytu (MCH)

MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) je zprůměrovaná hmotnost Hb v jednotlivé červené krvince proti počtu ostatních červených krvinek ve vzorku, viz vzorec (Zima et al., 2013).

$$\text{MCH [pg]} = \frac{\text{Hb (g/l)}}{\text{počet Er (l)}}$$

Střední (průměrná) koncentrace Hb v erytrocytu (MCHC)

MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) je zprůměrovaná hmotnost Hb v jednotlivých červených krvinkách proti objemu, který červené krvinky zaujímají v plazmě, tj. proti Ht, viz vzorec (Zima et al., 2013).

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hb (g/dl)}}{\text{Ht (\%)}}$$

3.2.2.2 Leukocyty

Bílé krvinky jsou jaderné buňky schopné améboidního pohybu, adheze k endotelu, výstupu z kapilár a dalšího postupu k místu určení. Pohyb je spuštěn produkty buněčného rozpadu či bakteriálními toxiny. Počet leukocytů je druhově rozdílný a neustále v těle jedince kolísá díky fyziologickým změnám, ale většinou je jejich zastoupení menší než erytrocytů. Například potkan má více lymfocytů než neutrofilů, naproti tomu např. pes nebo kočka mají tento poměr opačný. Základní dělení leukocytů je na granulocyty, monocyty a lymfocyty (Reece, 1998; Jelínek et Koudela, 2003).

Granulocyty

Granulocyty obsahují laločnaté jádro s granulemi v cytoplazmě. Dělí se na neutrofilu, eozinofily a bazofily (Jelínek et Koudela, 2003).

Neutrofilů tvoří 12 – 38 % cirkulujících bílých krvinek u potkanů (Doubek et al., 2003). Dokonce počet u právě narozených jedinců je značně vyšší (Nejedlý, 1967; Schermer, 1967). Jak uvádí Schermer (1967), průměr potkaního neutrofilu je 11 μm a jeho jádro je silně segmentované nebo svinuté, má četné výstupky a protoplasma obsahuje jemné a rozptýlené granule. Toman et al. (2000) popisuje, že zralé neutrofilů jsou produkovány rychlostí kolem miliónu buněk za sekundu a v krevním oběhu setrvávají zhruba šest hodin. Změny jsou patrné u postpubertálních samic, které vykazují změny v počtech a typech cirkulujících leukocytů během estrálního cyklu či je pozorován snížený počet neutrofilů během fáze diestru (Kuhn et Hadegg, 1991).

Eosinofily tvoří 1 – 4 % cirkulujících bílých krvinek. Velikostí jsou menší než neutrofilů a obsahují jádro prstencové struktury, které je vyplněné hrubými granulemi (Nejedlý, 1967; Schermer, 1967). Jak také uvádí Toman et al. (2000), v krevním oběhu jsou přítomny 6 – 12 hod.

Cirkulující bazofily jsou vzácné, a pokud jsou v krvi přítomné, bývají to ve skutečnosti „tkáňové“ bazofily z podkožní tkáně uvolněné v průběhu komprese ocasní žíly během odběru krve. „Krevní“ bazofily nejsou větší než typické granulocyty a jádra jsou segmentovaná. Oproti tomu „tkáňové“ jsou mnohem větší velikosti, mají malé a kruhové jádro zaplněné kulatými tmavě modrými granulemi (Schermer, 1967).

Lymfocyty

U potkanů převládají z leukocytů nejvíce lymfocyty, které zahrnují 60 – 75 % z celkového počtu bílých krvinek. Mohou být rozděleny na dvě skupiny dle velikosti, na malé a velké lymfocyty. Velké lymfocyty dosahují průměru až 15 μm a jejich cytoplazma má většinou tmavě modré zabarvení. Malé lymfocyty jsou častější, velikostí podobné erytrocytům (průměr 6,2 μm) a jejich cytoplazma obsahuje azurofilní granula (Schermer, 1967; Ringler et Dabich, 1979). Při odběru krve bez použití anestezie u zvířat často dochází k jejich stresu, který může výrazně změnit celkový počet bílých krvinek (WBC), například zvýšený počet lymfocytů až o 12 % (Schermer, 1967).

Monocyty

Jádro monocytů je u potkanů výrazně stočené nebo ledvinového tvaru a je obklopeno širokým protoplazmatickým lemem cytoplazmy, který může obsahovat azurofilní nebo červeno-fialové granule. Většinou představují 1 – 6 % z celkového počtu bílých krvinek (Schermer, 1967). Dle Tomana et al. (2000) v krvi kolují pouze zhruba osm hodin.

3.2.2.3 Trombocyty

Krevní destičky jsou buněčné fragmenty mající vlastnost shlukování, a tím se hůře počítají. Jejich životnost se počítá 3 – 5 dnů a zanikají v RHS. Obecně se počet trombocytů zvyšuje při graviditě, při tělesné námaze a pod vlivem adrenalinu (Nejedlý, 1967; Jelínek et Koudela, 2003). Počtem cirkulujících krevních destiček se zabývalo mnoho autorů. Například autoři Mitruka et Rawnsley (1981) uvádí rozmezí trombocytů $121 - 460 \times 10^3 / \text{mm}^3$. Podle Schermera (1967) je rozmezí dokonce vyšší a to $430 - 840 \times 10^3 / \text{mm}^3$.

3.2.3 Obecné srovnání hematologických dat vybraných autorů

		Feldman et al. (2000)	Pass et Freeth (1993)	Wolfensohn et Lloyd (2003)
RBC	[$\times 10^6 / \mu\text{l}$]	5,15 – 8,53	7,0 – 10,0	7,0 – 10,0
PCV	[%]	36,6 – 48,7	40,5 – 54,0	36,0 – 48,0
Hb	[g/dl]	10,9 – 15,4	11,0 – 19,0	11,0 – 18,0
WBC	[$\times 10^3 / \mu\text{l}$]	7,5 – 15,3	6,0 – 18,0	6,0 – 17,0
Neutrofilly	[%]	12,1 – 31,3	14,0 – 20,0	9,0 – 34,0
Lymfocyty	[%]	61,9 – 83,6	69,0 – 86,0	65,0 – 85,0
Eosinofily	[%]	0,3 – 1,9	1,0 – 4,0	0,0 – 6,0
Monocyty	[%]	1,4 – 5,0	1,0 – 6,0	0,0 – 5,0
Bazofily	[%]	0,01 – 0,17	-	0,0 – 1,5
Trombocyty	[$\times 10^3 / \mu\text{l}$]	980 – 1179	500 - 1000	500 - 1300

3.3 Biochemie

Obsah jednotlivých biochemických parametrů kolísá ve fyziologickém stavu v rozsahu průměrných hodnot. Změny stavu těchto složek mimo průměr nastávají zejména při poruchách metabolismu a jejich sledování lze využít v diagnostice chorob nebo v prevenci.

3.3.1 Triacylglycerol (TAG)

TAG patří mezi neutrální lipidy, jejichž základem je glycerol. Jak uvádí Jiran (1994), jsou přijímány buď potravou, nebo jsou endogenně produkovány v játrech a v tukové tkáni. Endogenní cestou dochází k syntéze z glycerol-3-fosfátu a z aktinovaných mastných kyselin (MK). Děje se tak v endoplasmatickém retikulu jater, enterocytů tenkého střeva, v tukových buňkách, ad. (Štern et al., 2005).

Triacylglyceroly se vyskytují jako převážná část lipidů v potravě. Trávení a resorpce začíná v duodenu a pokračuje v tenkém střevě. Za přítomnosti žlučových kyselin, produkováných játry, probíhá enzymová hydrolýza. Dochází k emulgaci lipidů za vzniku smíšených micel s lipidy. Většina žlučových kyselin se v tenkém střevě cestou vena portae vrací zpět do jater. TAG se hydrolyzují pankreatickou šťávou, která obsahuje enzymy lipázu, fosfolipázu a cholesterolesterazu. Ke vstřebávání enterocyty a transportu do krve dochází ve formě chylomikronů a lipoproteinů. Chylomikrony obsahují 85 – 95 % TAG (Jelínek et Koudela, 2003; Štern et al., 2005).

Jako nejvýznamnější zásoba energie je v organismu tuková tkáň. Zde jsou tzv. adipocyty, které jsou vybaveny enzymovým systémem pro syntézu nebo degradaci TAG, tedy jestli tuková tkáň produkuje nebo přijímá mastné kyseliny. Oba procesy jsou hormonálně regulovány. TAG jsou hydrolyzovány v adipocytech enzymem lipázou, aktivovaným adrenalinem, glukagonem, tyroxinem ad. Inaktivaci zajišťuje insulin a prostaglandin. Tato lipáza způsobuje uvolnění mastných kyselin z tukové tkáně a syntézu TAG. Další enzym lipoproteinová lipáza se nachází na endotelu buněk. Tento enzym zvyšuje cirkulaci mastných

kyselin a tím také syntézu TAG. Tato lipáza je aktivována insulinem nebo hyperglykemií (Štern et al., 2005).

Jako patologický stav je popsán jen u zvýšené hladiny triacylglycerolu, jako diabetes mellitus, pankreatitis, při onemocnění s nahromaděním glykogenu, při stavech hladovění, ad. (Jiran, 1994).

3.3.2 Cholesterol

Tento cholesterol, tvořen steranovým skeletem, se do organismu dostává exogenně potravou nebo je vytvořen endogenně. Podílí se na inaktivaci některých škodlivých látek a na ukládání tuku v játrech (Jelínek et Koudela, 2003).

Biosyntéza cholesterolu je energeticky velmi náročný proces, probíhající v endoplazmatickém retikulu buněk jater, v ledvinách, nadledvinách, v nervové tání, v pohlavních žlázách, kůži a v mléčné žláze. Jeho degradace je postupná, na částečné modifikační struktury. Nikdy není zcela rozložen. Vznikají tak žlučové kyseliny (kys. cholová, kys. chemodeoxycholová), steroidní hormony (pohlavní a hormony kůry nadledvin) a cholekalciferol. Cholesterol se v těle váže na proteiny a vytváří tzv. lipoproteiny. Mají přibližně kulovitý tvar s jednovrstevným povrchem, složeným z cholesterolu a fosfolipidů, jehož hydrofilní část je orientována ven a hydrofobní dovnitř (Jelínek et Koudela, 2003; Štern et al., 2005).

Lipoproteiny se dělí podle hustoty: VLDL – o velmi nízké hustotě

LDL – o nízké hustotě

IDL – o střední hustotě

HDL – o vysoké hustotě

Již v LDL je obsaženo 60 % cholesterolu. Hlavní funkcí LDL je transport cholesterolu k buňkám s LDL receptory a pokud je jeho příjem potravou dostatečný, inhibuje tvorbu endogenního

cholesterolu. Jeho vysoká hladina v krevní plazmě může způsobit vznik aterosklerózy (Jelínek et Koudela, 2003).

3.3.3 Kyselina močová

Kyselinka močová představuje konečný produkt metabolismu purinů. Řadí se mezi tzv. látky nebílkovinného dusíku. Vzniká při rozpadu buněčných jader v organismu či rozkladu masité stravy (Štern et al., 2005).

Tento metabolit je v postatě nerozpustný a je rizikovým faktorem např. pro obstrukci močových cest nebo poškození parenchymu ledvin. Je vylučována z těla ze 70 – 80 % pomocí ledvin a zbytek střevní sekrecí. Její hladina v krvi kolísá podle příjmu purinů v potravě. Může nastat stav hyperurikémie (dna), který je způsoben zvýšeným příjmem purinů, nižším vylučováním ledvinami, vyšší biosyntézou purinů, zvýšeným rozpadem buněk aj. (Jelínek et Koudela, 2003; Štern et al., 2005).

3.3.4 Hořčík (Mg)

Hořčík se řadí mezi makroprvky neboli minerální prvky obsažené v těle jedince v relativně velkém množství. Konkrétně se udává hodnota pohybující se kolem 0,05 % hmotnosti těla. Je označován jako intracelulární kationt, který je z 65 – 70 % uložený ve skeletu, pouze 1 % v extracelulární tekutině a zbytek se nachází v měkkých tkáních, jakými jsou svalovina, játra a nervová tkáň (Jelínek et Koudela, 2003).

Mg je součástí mnoha enzymů nebo slouží jako jejich aktivátor. Ovlivňuje metabolismus bílkovin, lipidů, sacharidů, aminokyselin, nukleových kyselin, vitamínů a minerálních látek. Ovlivňuje propustnost neboli permeabilitu buněčných membrán, nervovou činnost, nervosvalové dráždění či zasahuje do imunity. Je antagonistou pro vztah k vápníku a draslíku. V krvi je poměrně ve stálém množství v erytrocytech (Jelínek et Koudela, 2003; Jiran, 1994).

K resorpci Mg dochází aktivně nebo pasivně zejména v duodenu, ale částečně také v žaludku, tenkém a tlustém střevě. Vstřebávání výrazně ovlivňují zánětlivé procesy na sliznicích trávicího ústrojí, nadbytek vápníku, draslíku, strukturální vlákniny a dusíkaté látky v krmivu. Z organismu je hořčík vylučován nevstřebaný, ale také endogenní, a to výkaly i močí. Koncentrace Mg v moči reaguje na koncentraci v krevní plazmě, kdy se při jeho deficitu výrazně sníží i jeho vylučování močí. U všech druhů zvířat je schopnost reabsorpce Mg v ledvinových tubulech, což napomáhá udržování homeostaze hořčíku (Jelínek et Koudela, 2003).

Nedostatek hořčíku nastává při anorexii či při hypomagnesemii, kdy hlavním projevem je syndrom předráždění, třes svalstva a vznikají tonicko-klonické křeče. Zvýšená hladina Mg může nastat při dehydrataci či při Cushing-syndromu, ale obecně je to v podstatě ojedinělé a doprovázené zrychlenou peristaltikou střev (Jiran, 1994).

3.3.5 Železo (Fe)

Mikroelementy, též označované jako stopové prvky, jsou ve tkáních organismů zastoupeny ve velmi malém množství, mají však zásadní význam v řadě enzymatických, regulačních a katalytických pochodů (Jelínek et Koudela, 2003).

Železo (ferrum) je důležitým kationtem vyskytujícím se výhradně navázané na různé bílkoviny (hemové sloučeniny), na hemové enzymy a na nehemové sloučeniny jako je např. transferin (Štern et al., 2005). Jelínek et Koudela (2003) popisují, že tento významný prvek tvoří u zvířat 0,006 – 0,007 % hmotnosti živého těla. Dále uvádí procentuální zastoupení nejvýznamnějších míst v těle, ve kterých se tento stopový prvek vyskytuje. Tedy z celkového množství železa obsaženého v organismu je 65 % v krvi, 10 % ve slezině, 8 – 10 % ve svalech a do 2 % v jiných orgánech, jako mozek, pankreas, aj. (Jelínek et Koudela, 2003; Velíšek et Hajšlová, 2009).

V největší koncentraci se Fe nachází v krvi jako součást erytrocytů v hemoglobinu a každá molekula obsahuje 4 molekuly tohoto kationtu. Dále se vyskytuje v krevní plazmě jako růžově zabarvený glykometalprotein transferin, který je nehemový a slouží jako transportní

forma železa. Ve svalové tkáni je obsaženo ve formě myoglobinu, kdy každá molekula obsahuje jeden atom Fe. V orgánech jakými jsou játra, slezina, kostní dřen ad., je v podobě feritinu. (Jelínek et Koudela, 2003; Velíšek et Hajšlová, 2009).

Hladina Fe je závislá na příjmu v krmivu, kdy se při nedostatku jeho obsah v plazmě snižuje. Vstřebávání probíhá v celém úseku trávicí soustavy, zejména v jejunu. Resorpce je poměrně složitá, jelikož míra vstřebávání je do 10 % a zvyšuje se až při výrazném deficitu. V krmivu se vyskytuje jako trojmocné železo, ale resorbuje se jako dvojmocná forma. V žaludku dochází k jeho redukci pomocí kyseliny chlorovodíkové, kyseliny askorbové, cysteinu, lyzinu a histidinu. Fe přijaté do střevních buněk se transformuje biochemickým procesem na feritin, který přestupuje do krevní plazmy, kde je transportován vázaný na transferin. Resorpce je ovlivněna věkem jedince, zdravotním stavem, mírou nasycení organismu Fe a dalšími faktory. Zdravý živočich vstřebá pouze tolik železa, kolik jeho organismus spotřebuje. Skladuje se jako hemosiderin v játrech a přebytek tělo vylučuje (Jelínek et Koudela, 2003; Jiran, 1994).

Snížená hladina železa je při anémii, po infekcích, parazitózách, při avitaminózách C, aj. Zvýšená hladina je u akutní hepatitis, cirhóze jater či hemochromatóze, což je vzácné onemocnění úložných míst železa (Jiran, 1994).

4 Materiál a Metody

4.1 Materiál

4.1.1 Laboratorní potkani použití v experimentu

Ve výživovém pokusu byli použiti outbrední laboratorní potkani kmene Wistar, shodného pohlaví - samci, stejného věku (± 5 dní). Byli dodáni firmou Velaz s.r.o. z chovného zařízení v Kolči u Kladna. Výživový pokus probíhal ve Fyziologickém ústavu AV ČR na odd. Biologické kontroly v Praze. Věk jedinců na začátku pokusu byl 62 dní.

Potkanům byl stanoven světelný režim 12 x 12 hodin, byli chováni v průhledných boxech o velikosti 60 x 40 cm při výšce 35 cm, plastových po stranách a svrchní straně kovové pletivo. V boxech bylo umístěno po 2 kusech potkanů. Před zahájením pokusu nebylo učiněno žádné speciální vyšetření zdravotního stavu, pouze základní kontrola. Byl proveden odběr před pokusem z kolaterální ocasní žíly pro stanovení hematologických a biochemických parametrů. Po experimentu byla zvířata inhalačně uspaná a byl proveden odběr krve punkcí ze srdce in vivo, ale s následným usmrcením, opět pro analýzu hematologických a biochemických parametrů. Pro hematologické vyšetření byla potřeba krev nesrážlivá, proto byla ošetřena přidáním K_2EDTA (draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové). Pro biochemické vyšetření byla potřeba sražená krev, tedy její plazma.

4.1.2 Složení krmných dávek

Laboratorní potkani kmene Wistar byli rozděleni do tří skupin po 10 kusech, kdy každá skupina byla krmena odlišnou dávkou homogenizovaného hovězího masa. V období před pokusem (10 dní) byly všechny tři skupiny krmeny standardní jadrnou směsí VELAZ – ST1 adlibitně, viz Tab. 2 a 3. Tato směs je obecně používána pro krmení myší a potkanů v laboratořích. Experiment trval 30 dní a krmení bylo následující: skupina č. 1 (kontrolní) dále

pokračovala v krmení jadrnou směsí VELAZ – ST1 adlibitně, skupina č. 2 byla krmena jadrnou směsí VELAZ – ST1 (6 g) a homogenizovaným hovězím masem (10 g), jehož množství odpovídalo obsahu dusíkatých látek standardní jadrné směsi, a skupina č. 3 byla krmena adlibitně pouze homogenizovaným hovězím masem, viz Tab. 4. Voda byla ve všech skupinách ad libitum. Krmení probíhalo jednou denně v nadbytku (o známé hmotnosti) a přebytky byly vždy následující krmení odebrány a zváženy.

Tab. 2 Jakostní znaky v kg směsi

Vlhkost	12,5 %
Dusíkaté látky	24 %
Vláknina	4,4 %
Tuk	3,4 %
Popel	6,8 %
Lysin	14 g
Methionin	4,8 g
Vápník	11 g
Fosfor	7,2 g
Sodík	1,8 g
Vitamín A	28 000 m.j.
Vitamín D	2 200 m.j.
Vitamín E	100 mg
Měď	20 mg
Selen	0,38 mg

(Online 25. 2. 2015; dostupné na www.velaz.cz)

Tab. 3 Složení jadrné krmné směsi VELAZ – ST1 (Velaz s.r.o.)

Pšenice	46 %
Oves setý	3 %
Úsušky píce vojtěšky mladé	2,5 %
Pšeničná mouka krmná	1,5 %
Pšeničné otruby	5 %
Rybí moučka	12 %
Sojový extrahovaný šrot	22 %
Kukuřice	6 %
Mletý vápenec	1,2 %

Dále: kvasnice, dihydrogenfosforečnan vápenatý, sůl kamenná, DL methionin, L lysin, vitaminy A, D3, E, síran měďnatý pentahydrát, seleničitan sodný, buthylhydroxyanisol, butylhydroxytoluen, etoxyquin.

Tab. 4 Složení homogenizovaného hovězího masa

pH	4,98 ± 0,05	
Sušina	23,53 ± 0,47	%
Voda	76,47 ± 1,53	%
Bílkoviny	21,03 ± 0,50	%
Celkový tuk	2,2 ± 0,1	%
Sacharidy	< 0,15	%
Popel	1,08 ± 0,03	%
Cholesterol	576 ± 13 %	mg/kg hmoty
Fibrinové vlákno	0,34 ± 0,03	%
Karbohydráty	< 0,1	g/100g
Energetická hodnota	442 ± 9,3	kJ/100g
Energetická hodnota	105 ± 2,2	kcal/100g
Hydroxyprolin	0,26 ± 0,01	%
Vápník	39,9 ± 2,00	mg/100g
Selen	0,044 ± 15%	mg/kg
Železo	22,7 ± 8%	mg/kg
Hořčík	198 ± 10%	mg/kg

Dle projektu 2B08037

4.1.3 Přístrojové vybavení

Při stanovování krevních parametrů byl využit hematologický analyzátor (Coulter counter) firmy NIHON KOHDEN (MEK – 5208 K).

Pro rychlé a přesné ředění krve byl použit přístroj COULTER DUAL DILUTER III, který je poloautomatický a přenosný.

Při biochemickém vyšetření krve se využíval spektrofotometr Libra 22 firmy Fisher Scientific, který slouží k měření absorbancí.

4.2 Metodika

Pokus byl schválen dle projektu 2B08037.

4.2.1 Metody stanovení hematologických ukazatelů

4.2.1.1 Stanovení počtu erytrocytů, MCV a hodnot hematokritu

Pro stanovení těchto ukazatelů je potřebné množství krve 20 μ l a používá se ředění krve v poměru 40 000 : 1. Ředícím roztokem je Isotonac (MEK – 510). Naředěná krev se řádně promíchá. V hematologickém analyzátoru se proměří vzorky v poloze RBC/HCT a z displeje se zaznamenají hodnoty počtu erytrocytů a hematokritu. Poté se přepne přístroj do polohy RBC/MCV a zaznamenají se hodnoty MCV. Vždy se mezi jednotlivými vzorky musí přístroj vyresetovat.

4.2.1.2 Stanovení hemoglobinu

Pro stanovení hemoglobinu je potřebné množství krve 20 μ l. Vzorek se ředí v poměru 20 : 1 ředícím roztokem. Po promíchání je důležitá hemolýza erytrocytů, aby došlo k uvolnění Hb do roztoku a bylo možné změřit jeho množství. Jako hemolyzační činidlo se používá LYSE – C NK. Hematologický analyzátor se přepne do polohy WBC/Hb a změří se vzorek. Naměřené hodnoty zaznamenáme z displeje, vyresetujeme přístroj a pokračujeme v měření dalšího vzorku.

4.2.2 Metody stanovení biochemických ukazatelů

Biochemické ukazatele byly stanoveny pomocí diagnostické sady Bio-La-Test pro konkrétní analýzy (Chol L 250 S aj.), od výrobce PLIVA – Lachema Diagnostika s.r.o.

4.2.2.1 Stanovení triacylglycerolu

Byla použita souprava TG L 250 S pro enzymatické fotometrické stanovení TAG. Měření byla provedena při vlnové délce 500 nm, teplota 37 °C a objemový poměr vzorku/reakční směs 1/101.

Princip metody: TAG se hydrolyzují lipoproteinovou lipasou na glycerol a volné mastné kyseliny. Glycerol je fosforylován ATP za katalýzy glycerolkinasou na glycerol-3-fosfát. Tento produkt je oxidován za katalýzy glycerolfosfát oxidasou na dihydroxyacetonfosfát za vzniku peroxidu vodíku. Konečná fáze je oxidační kopulace 4-aminoantipyrinu s 4-chlorfenolem za přítomnosti peroxidu vodíku a katalýzy peroxidasou. Vznikne červeně zbarvený chinonimin.

Triacylglyceroly \longrightarrow glycerol + volné mastné kyseliny

Glycerol + ATP \longrightarrow glycerol-3-fosfát + ADP

Glycerol-3-fosfát + O₂ \longrightarrow dihydroxyacetonfosfát + H₂O₂

2 H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + 4-chlorfenol \longrightarrow chinonimin + 4 H₂O

Příprava pracovních roztoků:

	Blank činidla	Standard	Vzorek
Činidlo 1	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Vzorek	-	-	0,01 ml
Standard	-	0,01 ml	-
Destilovaná voda	0,01 ml	-	-

Promíchá se a inkubuje 10 min. při 37 °C. Poté se změří absorbance (A) vzorku a standardu proti blanku činidla.

Výpočet:

$$\text{TAG [mmol/l]} = \frac{\Delta A_{\text{vzorek}}}{\Delta A_{\text{stand}}} \times C_{\text{stand}}$$

C = koncentrace standardu

4.2.2.2 Stanovení cholesterolu

Byla použita souprava CHOL L 250 S pro enzymatické fotometrické stanovení celkového cholesterolu. Měření byla provedena při vlnové délce 500 nm, teplota 37 °C a objemový poměr vzorek/reakční směs 1/101.

Princip metody: Prvním krokem je hydrolýza na volný cholesterol a mastné kyseliny za katalýzy cholesterolesterasou. Dále nastává oxidace za katalýzy cholesteroloxidasou na 4-cholesten-3-on a peroxid vodíku. Poslední fází je oxidační kopulace 4-aminoantipyrinu s fenolem za přítomnosti H₂O₂ a katalýzy peroxidasou. Vznikne růžovo – červený chinonimin, jehož intenzita zbarvení je úměrná koncentraci cholesterolu.

Estery cholesterolu + H₂O → cholesterol + volné mastné kyseliny

Cholesterol + O₂ → 4-cholesten-3-on + H₂O₂

2 H₂O₂ + fenol + 4-aminoantipyrin → chinonimin + 4 H₂O

Příprava pracovních roztoků:

	Blank činidlo	Standard	Vzorek
Činidlo 1	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Vzorek	-	-	0,01 ml
Standard	-	0,01 ml	-
Destilovaná voda	0,01 ml	-	-

Jednotlivé vzorky se promíchají a nechají se 10 min. inkubovat při teplotě 37 °C. Poté se změří absorbance (A) vzorku a standardu proti blanku činidla.

Výpočet:

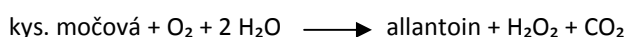
$$\text{Cholesterol [mmol/l]} = \frac{\Delta A_{\text{vzorek}}}{\Delta A_{\text{stand}}} \times C_{\text{stand}}$$

C = koncentrace standardu

4.2.2.3 Stanovení kyseliny močové

Byla použita souprava UA L 500 pro stanovení koncentrace kyseliny močové. Měření byla provedena při vlnové délce 550 nm, teplota 37 °C a objemový poměr vzorek/reakční směs 1/51.

Princip metody: kys. močová se oxiduje kyslíkem za katalýzy enzymem urikasou na peroxid vodíku a allantoin. Vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací se sodnou solí N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidinu (TOOS) a 4-aminoantipyrinem za katalýzy enzymem peroxidasou a vznikne červeně zbarvený chinonimin.



Příprava pracovních roztoků:

	Reagenční blank	Standard/kalibrátor	Vzorek
Pracovní roztok	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Vzorek	-	-	0,02 ml
Standard/kalibrátor	-	0,02 ml	-
Destilovaná voda	0,02 ml	-	-

Jednotlivé zkumavky se promíchají a po 1 – 2 min. inkubace se odečítá absorbance (A) blanku, vzorku a standardu.

Výpočet:

$$\text{Kys. močová } [\mu\text{mol/l}] = \frac{A_{\text{vzorek}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{stand}} - A_{\text{blank}}} \times C_{\text{stand}}$$

C = koncentrace standardu

4.2.2.4 Stanovení hořčíku

Byla použita souprava Mg L 2x125 pro fotometrické stanovení hořčíku. Měření byla provedena při vlnové délce 520 nm, teplota 37 °C a objemový poměr vzorek/reakční směs 1/101.

Princip metody: hořčík tvoří s kalmagitem v alkalickém prostředí barevný komplex. EGTA eliminuje interferenci vápníku.

Příprava pracovních roztoků:

	Blank činidla	Standard	Vzorek
Pracovní roztok	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Vzorek	-	-	0,01 ml
Standard	-	0,01 ml	-
Destilovaná voda	0,01 ml	-	-

Promíchá se a inkubuje 5 min. při teplotě 37 °C. Změří se absorbance (A) vzorku a standardu proti blanku činidla.

Výpočet:

$$\text{Hořčík [mmol/l]} = \frac{\Delta A_{\text{vzorek}}}{\Delta A_{\text{stand}}} \times C_{\text{stand}}$$

C = koncentrace standardu

4.2.2.5 Stanovení železa

Byla použita souprava Fe L 200 pro přímé kolorimetrické stanovení železa. Měření byla provedena při vlnové délce 593 nm, teplota 37 °C a objemový poměr vzorek/reakční směs 1/6,25.

Princip metody: železo se v pufru o pH 4,8 uvolňuje z vazby na transferin a redukuje se na železnaté ionty. Uvolněné ionty Fe^{2+} tvoří s Ferene S {(3-(2-pyridil)-5,6-bis-2-(5-furylsulfonová kyselina)-1,2,4-triazin)} stabilní barevný komplex. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství železa ve vzorku. Interference mědi je eliminována reakčními podmínkami a přidávkem maskujícího činidla.

Příprava pracovních roztoků:

	Reagenční blank	Sérový blank	Vzorek	Standard
Destil. voda	0,2 ml	0,05 ml	-	-
Vzorek	-	0,2 ml	0,2 ml	-
Standard	-	-	-	0,2 ml
Činidlo R1	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Činidlo R2	0,05 ml	-	0,05 ml	0,05 ml

Promíchá se a inkubuje 5 min. při teplotě 37 °C. Poté se odečte absorbance sérového blanku (A1) proti destilované vodě a absorbance vzorku (A2) a standardu (A3) proti reagenčnímu blanku.

Výpočet:

$$\text{Železo } [\mu\text{mol/l}] = \frac{A_2 - A_1}{A_3} \times C_{\text{stand}}$$

C = koncentrace standardu

4.2.3 Statistické zpracování dat

Naměřené hodnoty byly zpracovány dle odborné literatury a s ní souvisejícím statistickým programem R language and environment for statistical computing (Development core team, 2008). Prvním krokem bylo zjistit, zda jsou naměřená data normálně distribuovaná, tedy gausiánsky. K tomu byl použit Shapiro – Wilk test, který je podle Razali et Wah (2011) nejlepší, tj. má nejvyšší výpovědní hodnotu. Pro porovnávání ukazatelů ve všech skupinách ve smyslu před a po pokusu byl použit párovaný a nepárovaný t – test. Pro zjištění, zda existují rozdíly v datech před a po dodržování pokusné mono-diety, byl použit ANOVA test (analýza odchylek). Dále byly doplňkově použity Kruskal – Wallis test a Nemenyi test (v závislosti parametrických či neparametrických datech).

Testování probíhalo na hladině významnosti $p = 0,05$. Pro porovnávání a zhodnocování pokusu byly použity běžné popisné statistické charakteristiky jako aritmetický průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální naměřená hodnota.

5 Výsledky

5.1 Hematologické ukazatele

Tabulky 5 – 17 poskytují základní statistické ukazatele krevního obrazu ze začátku a konce výživového pokusu. Sledovanými parametry byly počet erytrocytů, hematokrit, hemoglobin a MCV.

5.1.1 Statistické vyhodnocení hematologických dat

Před jakýmkoli zpracováním dat se nejprve musí ověřit, zda jsou naměřené hodnoty tzv. normálně distribuované, tedy zda odpovídají Gaussově křivce. K tomuto ověření byl použit Shapiro – Wilk test, který má podle Razali et Wah (2011) nejvyšší výpovědní hodnotu, viz Tab 5 a Tab 6. Výsledky tohoto testování slouží pro výběr vhodných následujících testů (parametrické či neparametrické).

Veškeré testování během pokusu probíhalo na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tab. 5 p-hodnoty Shapiro – Wilk(ova) testu před pokusem

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
Er	0,9056	0,0034	0,2872
Ht	0,9493	0,0161	0,3318
MCV	0,1724	0,9001	0,9127
Hb	0,5151	0,8684	0,0938

Tab. 6 p-hodnoty Shapiro – Wlk(ova) testu po pokusu

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
Er	0,4778	0,0021	0,8611
Ht	0,9825	0,0132	0,1893
MCV	0,1269	0,8398	0,8679
Hb	0,2563	0,9441	0,5279

Podle Tab. 5 a 6 je zřejmé, že některé p – hodnoty u skupiny 2 jsou negausiánské i přesto, že by se očekávala normální distribuce dat jako u ostatních skupin. Domnívám se, že mohla nastat chyba měření, další příčina mohl být malý vzorek (n=10), jelikož čím je k dispozici více vzorků, tím je menší šance zkresleného výsledku. Proto vzorky skupiny 2 budou následovně interpretovány s opatrností.

Další otázkou je prověření podobnosti skupin před zahájením pokusu. Důvodem je ověření, že všechna data pocházela z jedné distribuce, tedy že jsou „shodná“. Toto testování dává jistotu, že rozdíly pozorované po pokusu nebyly přítomny již před pokusem (př. genetika). Pro parametrické hodnoty byl použit ANOVA test a pro neparametrické hodnoty Kruskal – Wallis test. Viz Tab. 7.

Tab. 7 Podobnost/shodnost skupin před pokusem

	p-hodnota	Závěr
Er	0,2431	Shodné
Ht	0,0414	Rozdíl
MCV	0,2499	Shodné
Hb	0,1007	Shodné

Závěry Tab. 7 ukazují, že kromě hodnot hematokritu jsou veškerá data tzv. „shodná“, (matematicky patří do jedné distribuce dat). Rozdílem vyskytujícím se u Ht se zabývá diskuze.

Stejné testování podobnosti mezi jednotlivými skupinami bylo provedeno i po pokusu, tedy testování mezi skupinami již s odlišnou dietou. Viz Tab. 8.

Tab. 8 Podobnost/shodnost skupin po pokusu

	p-hodnota	Závěr
Er	0,0118	Rozdíl
Ht	0,0438	Rozdíl
MCV	0,2115	Shodné
Hb	0,0001	Rozdíl

Závěry z Tab. 8 ukazují, že po pokusu nastaly rozdíly, konkrétně v počtu erytrocytů a u hemoglobinu. MCV zůstalo po pokusu shodné. Nelze ovšem tvrdit, že MCV je stejné jako před pokusem, že nenastala změna. Tuto skutečnost lze prověřit párováním t – testem, viz Tab. 9, která nám říká, jaká je pravděpodobnost, že rozdíl mezi skupinami před a po pokusu je čistě náhodný.

Tab. 9 p-hodnoty před a po pokusu

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
Er	0,58119	0,14844	0,01997
Ht	0,09691	0,02344	0,08207
MCV	0,00002	0,00953	0,00081
Hb	0,00217	0,22213	0,00746

Je nutné vysvětlit, že testování v Tab. 9 probíhalo v rámci skupin, tedy zvlášť skupina 1 před a po pokusu, zvlášť skupina 2 před a po pokusu a stejně skupina 3 před a po pokusu.

5.1.2 Erytrocyty

V Tab. 10 a 11 jsou uvedeny základní popisné statistické charakteristiky z naměřených hodnot před a po pokusu. (T/l – tera = 10^{12})

Tab. 10 Počet erytrocytů před pokusem [T/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	8,31	0,71	6,93	10,20
Skupina 2	10	9,42	1,49	7,61	14,70
Skupina 3	10	8,13	0,51	6,84	9,57

Tab. 11 Počet erytrocytů po pokusu [T/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	9	8,10	0,88	6,28	10,20
Skupina 2	8	8,16	0,45	6,56	8,61
Skupina 3	8	9,07	0,29	8,44	9,70

Pokud si položíme otázku, zda mono-dieta hovězího masa měla vliv na Er, lze z předešlých tabulek vyčíst, že ke změnám hodnot došlo. Dle Tab. 7 a 8 je patrný rozdíl po pokusu a Tab. 9 toto tvrzení následně potvrzuje.

5.1.3 Hematokrit

V Tab. 12 a 13 jsou uvedeny opět základní popisné statistické charakteristiky z naměřených hodnot před a po pokusu.

Tab. 12 Hematokrit před pokusem [%]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	56,48	4,68	47,60	67,5
Skupina 2	10	62,12	8,53	50,10	89,7
Skupina 3	10	53,11	2,13	47,30	56,40

Tab. 13 Hematokrit po pokusu [%]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	9	50,87	5,16	39,40	61,70
Skupina 2	8	52,58	3,53	41,00	56,90
Skupina 3	8	56,81	1,59	51,50	61,00

Při kontrole podobnosti skupin u hodnot Ht byl zjištěn rozdíl již před zahájením pokusu (Tab. 7). Aby se mohlo v testování Ht dále v rámci pokusu pokračovat, musely by být data jednotlivých skupin shodná. Proto nelze dále hematokritové hodnoty používat.

5.1.4 Hemoglobin

V Tab. 14 a 15 jsou uvedeny opět základní popisné statistické charakteristiky z naměřených hodnot před a po pokusu.

Tab. 14 Hodnoty hemoglobinu před pokusem [g/100ml]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	17,20	1,12	15,10	20,40
Skupina 2	10	16,30	0,62	14,60	18,00
Skupina 3	10	16,02	0,52	15,00	16,60

Tab. 15 Hodnoty hemoglobinu po pokusu [g/100ml]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	9	14,72	0,61	13,00	15,90
Skupina 2	8	15,88	0,86	14,10	17,60
Skupina 3	8	16,85	0,41	16,10	17,50

Při kontrole, zda jsou hodnoty Hb před pokusem shodné, došlo k potvrzení (Tab. 7). Testováním po pokusu byl potvrzen rozdíl mezi skupinami (Tab. 8) a následně Tab. 9 zobrazuje, že rozdíl nastal nejen očekávaně ve skupině 3, ale také v kontrolní skupině 1.

5.1.5 MCV

V Tab. 16 a 17 jsou uvedeny opět základní popisné statistické charakteristiky z naměřených hodnot před a po pokusu. (fl – femto = 10^{-15})

Tab. 16 Hodnoty MCV před pokusem [fl]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	68,10	2,48	63,00	72,00
Skupina 2	10	66,40	2,28	61,00	72,00
Skupina 3	10	65,60	2,48	59,00	71,00

Tab. 17 Hodnoty MC po pokusu [fl]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	9	62,89	2,12	60,00	66,00
Skupina 2	8	64,38	1,22	62,00	67,00
Skupina 3	8	62,63	1,88	58,00	67,00

Podobnost dat mezi skupinami před pokusem byla u MCV potvrzena (Tab. 7). Následně bylo při testování zjištěno, že po pokusu také nevznikl rozdíl (Tab. 8). Tato skutečnost může vést k názoru, že u hodnot MCV nenastal žádný rozdíl během pokusu. Ovšem Tab. 9 potvrzuje, že rozdíl nastal, dokonce ve všech skupinách včetně kontrolní skupiny 1.

5.2 Biochemické ukazatele

Při chemické analýze výživového pokusu byly vyhodnoceny parametry pro triacylglycerol, cholesterol, kyselinu močovou, hořčík a železo. Hodnotily se jednotlivé skupiny zvláště, jako u předešlé hematologické analýzy s tím rozdílem, že kontrolní odběr vzorků před pokusem byl vytvořen z náhodně vybraných 10ti vzorků z celkových 30ti odběrů. Následné rozdělení vzorků je již dle plánu pokusu do 3 skupin. Všechny získané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 18 – 30.

5.2.1 Statistické vyhodnocení biochemických dat

Jako v případě hematologických dat i zde bylo nutné ověřit distribuci jednotlivých hodnot, opět Shapiro – Wilk testem, viz Tab. 18 a Tab. 19.

Tab. 18 p-hodnoty Shapiro – Wilk(ova) testu před pokusem

	Souhrn 10ti vzorků
Triacylglycerol	0,8246
Cholesterol	0,3032
Kys. močová	0,5012
Hořčík	0,3234
Železo	-

Tab. 19 p-hodnoty Shapiro – Wilk(ova) testu po pokusu

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
Triacylglycerol	0,1065	0,8445	0,1053
Cholesterol	0,3895	0,5579	0,4634
Kys. močová	0,5159	0,4701	0,3659
Hořčík	0,2164	0,5173	0,8149
Železo	0,9808	0,2247	0,8812

Podle Tab. 18 a 19 je zřejmé, že veškeré hodnoty jsou gausiánsky distribuované. Následovalo testování shody skupin po pokusu, viz Tab. 20. Testování skupin před pokusem nebylo možné, jelikož nebyly k dispozici 3 skupiny vzorků, ale pouze souhrn 10ti vzorků ze všech tří skupin dohromady.

Tab. 20 Podobnost skupin po pokusu

	p-hodnoty	Závěr
Triacylglycerol	0,0036	Rozdíl
Cholesterol	0,0004	Rozdíl
Kys. močová	0,8792	Shodné
Hořčík	0,4927	Shodné
Železo	0,0393	Rozdíl

Z Tab. 20 vyplývá, že rozdíl nastal u TAG, cholesterolu a Fe oproti kys. močové a Mg, u kterých vyšla shoda. Následující Tab. 21 vypovídá o pravděpodobnosti čistě náhodného případného rozdílu mezi hodnotami před a po pokusu.

Tab. 21 Pravděpodobnost shody hodnot před a po pokusu

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
Triacylglycerol	0,0055	0,3889	0,7449
Cholesterol	0,0029	0,000007	0,0000003
Kys. močová	0,8365	0,8672	0,5666
Hořčík	0,000000018	0,0000024	0,0000000025
Železo	-	-	-

Tab. 21 byla vypočítána nepárováním t – testem, jelikož data před pokusem byla náhodně vybrána ze všech skupin a nelze je tedy spárovat s daty po pokusu. Testoval se tedy

souhrn 10ti vzorků před pokusem s kontrolní skupinou 1 po pokusu, souhrn 10ti vzorků se skupinou 2 a souhrn 10ti vzorků se skupinou 3 po pokusu.

5.2.2 Triacylglycerol

V Tab. 22 a 23 jsou uvedeny základní popisné statistické charakteristiky naměřených hodnot před a po pokusu.

Tab. 22 Hodnoty TAG před pokusem [mmol/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Před pokusem	10	0,97	0,21	0,44	1,54

Tab. 23 Hodnoty TAG po pokusu [mmol/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	1,54	0,39	1,07	2,52
Skupina 2	10	0,87	0,15	0,60	1,21
Skupina 3	9	0,93	0,24	0,63	1,42

Z Tab. 20 je patrné, že po pokusu u TAG nastal rozdíl a Tab. 21 doplňuje, že rozdíl nastal pouze u kontrolní skupiny 1.

5.2.3 Cholesterol

V Tab. 24 a 25 jsou opět uvedeny základní popisné statistické charakteristiky naměřených hodnot před a po pokusu.

Tab. 24 Hodnoty cholesterolu po pokusu [mmol/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Před pokusem	10	1,29	0,16	0,96	1,51

Tab. 25 Hodnoty cholesterolu po pokusu [mmol/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	1,75	0,28	1,14	2,20
Skupina 2	10	1,86	0,17	1,49	2,16
Skupina 3	9	2,46	0,25	1,94	2,83

Z Tab. 20 je patrné, že u cholesterolu po pokusu nastal rozdíl. Tab. 21 doplňuje, že rozdíl nastal u všech skupin.

5.2.4 Kyselina močová

V Tab. 26 a 27 jsou opět uvedeny základní popisné statistické charakteristiky naměřených hodnot před a po pokusu.

Tab. 26 Hodnoty kys. močové před pokusem [$\mu\text{mol/l}$]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Před pokusem	10	166,45	46,27	91,09	284,32

Tab. 27 Hodnoty kys. močové po pokusu [$\mu\text{mol/l}$]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	161,21	43,06	85,57	234,63
Skupina 2	10	162,31	33,13	102,13	259,48
Skupina 3	9	150,90	43,14	85,57	237,39

Z Tab. 20 vyplývá, že hodnoty kys. močové vykazují shodnost po pokusu. Tab. 21 následně potvrzuje shodnost u všech tří skupin před a po pokusu.

5.2.5 Hořčík

V Tab. 28 a 29 jsou uvedeny základní popisné statistické charakteristiky naměřených hodnot před a po pokusu.

Tab. 28 Hodnoty Mg před pokusem [mmol/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Před pokusem	10	0,66	0,09	0,52	0,80

Tab. 29 Hodnoty Mg po pokusu [mmol/l]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	10	1,30	0,11	1,09	1,66
Skupina 2	10	1,31	0,17	0,94	1,63
Skupina 3	9	1,37	0,09	1,18	1,55

Z Tab. 20 vyplývá, že hodnoty Mg vykazují shodnost po pokusu, ovšem Tab. 21 ukazuje velkou rozdílnost při porovnávání před a po pokusu a to u všech tří skupin.

5.2.6 Železo

V Tab. 30 jsou statistické charakteristiky naměřených hodnot po pokusu. Data naměřená před pokusem nejsou k dispozici.

Tab. 30 Hodnoty Fe po pokusu [$\mu\text{mol/l}$]

	Počet zvířat	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Skupina 1	8	61,33	30,56	1,83	131,29
Skupina 2	9	104,61	34,55	58,43	164,52
Skupina 3	8	67,93	29,22	20,45	119,60

Z Tab. 20 vyplývá, že u Fe po pokusu nastal rozdíl, ale vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici ani souhrnné hodnoty před pokusem, nelze učinit porovnání dat.

6 Diskuze

6.1 Hematologické ukazatele

Základní hematologické parametry u potkanů jsou dnes často součástí vědeckých prací a odborné literatury. Sledovanými parametry v mé diplomové práci byly erytrocyty, hematokrit, hemoglobin a MCV. Ve vytvořeném výživovém pokusu byly tyto ukazatele rozděleny do tabulek podle typu diety (1. skupina/kontrolní jadrná KS; 2. skupina kombinace jadrné KS/hovězí maso; 3. skupina hovězí maso) a podle odběru před zahájením pokusu či po jeho ukončení. Všechna data byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Prvním z ukazatelů je počet erytrocytů. Pro kontrolu byla spočítána pravděpodobná shodnost před pokusem (Tab. 7), která ukazuje podobnost parametrů ($p = 0,2431$). Následně Tab. 8 ukazuje vzniklý rozdíl v počtu erytrocytů po pokusu ($p = 0,0118$). Při detailnějším zkoumání v jakých skupinách nastal rozdíl, Tab. 9 jasně potvrzuje, že rozdíl vznikl pouze u skupiny 3 ($p = 0,0199$). Vzniklý rozdíl po pokusu potvrdil, že mono – dieta hovězího masa měla vliv na změnu v počtu červených krvinek. I přes odlišné krmné dávky u jednotlivých skupin se naměřené hodnoty (Tab. 10 a 11), tedy jejich rozmezí ze všech měření 8,10 – 9,42 T/l, shodují s rozmezími jiných autorů. Například Knotková et Knotek (2000) uvádí hodnoty v rozmezí 5,50 – 9,50 T/l, Wolfensohn et Lloyd (2003) ve své publikaci zmiňují rozmezí 7,00 – 10,00 T/l. Feldman et al. (2000) popsal rozmezí počtu erytrocytů mezi 7,06 – 9,14 T/l, konkrétně u samců ve 3 měsících věku, tedy ve stejném věku a pohlaví jako jedinci z mého pokusu. Ovšem parametry se mohou dále vyvíjet, jelikož jak Živná (2001) uvádí, hematologické hodnoty se mění během růstu, tedy věkem, dále pohlavím, kmenem ad. Počet červených krvinek je po narození nízký a během růstu jedinců se hladina zvyšuje. To dokazuje opět Feldman et al. (2000), který uvádí ve svých tabulkách hodnoty od věku 25 dnů, kdy se hodnoty pohybují kolem 5,00 T/l až do 15. měsíce života, kdy se hodnoty zvýšily přes 8,00 T/l, a to bez ohledu na pohlaví.

Dalším zkoumaným ukazatelem byl hematokrit. Opět se kontrolovalo, zda hodnoty Ht byly shodné před zahájením pokusu, Tab. 7 ale ukazuje zjištěný rozdíl ($p = 0,0414$). Pro další testování v rámci pokusu musí být data před pokusem shodná, tedy matematicky řečeno pocházet ze stejné distribuce. Z tohoto důvodu nelze dále hematokritové hodnoty používat, jelikož by případné rozdíly po pokusu byly zkreslené a tedy závěry pro potvrzení či vyvrácení vlivu diety nesprávné. Z jakého důvodu tomu tak bylo, nelze určit, domnívám se, že příčinou mohla být například chyba při odběru vzorků. Přesto lze v následujících tabulkách Ht dále nalézt. Například Tab. 8 zabývající se podobností skupin po pokusu skutečně ukazuje rozdíl, ovšem nejde o rozdíl způsobený pokusem. Také byly vypočítány popisné statistické charakteristiky (Tab. 12 a 13), jejichž rozmezí se v rámci pokusu pohybovalo 50,87 – 62,12 %. Vědecká literatura zabývající se hematokritem u potkanů často řeší změny Ht hodnoty způsobené růstem. Jak jedinec roste a přibývá na váze, zvyšuje se i hematokrit. Například Lee et Blaufox (1985) vytvořili studii, kde byli potkani kmene Wistar rozděleni do skupin podle tělesné hmotnosti a stanovovala se Ht hladina. Ve skupině s hmotností <120 g byl naměřen Ht $40,00 \pm 2,46$ % a ve skupině >120 g byl Ht $43,28 \pm 2,77$ %. Belcher et Harris (1957) se také zabývali mladými rostoucími potkany a vytvořili následující rozmezí hmotností a hodnot Ht: 26 – 50 g 29,10 %; 51 – 75 g 33,00 %; 76 – 100 g 33,80 %; 101 – 125 g 35,20 %; 126 – 150 g 38,10 %; 151 – 175 g 38,80 %; 176 – 200 g 42,70 %; 201 – 225 g 42,70 % a 226 – 250 g 40,70 %. Rozdíl Ht hodnoty mezi samci a samicemi je u mnoha autorů vyhodnocen jako nevýznamný. Feldman et al. (2000) udává, že samice (26. – 30. den věku) mají Ht $39,07 \pm 2,30$ % vs. samci stejného věku mají hodnotu $37,70 \pm 2,10$ %, Ve 3. měsíci dosahovala hematokritová hodnota u samic $46,70 \pm 2,00$ % a u samců $47,10 \pm 5,90$ %. Tělesné hmotnosti jedinců mého pokusu bohužel neznám, ale tyto prezentované hodnoty jsou spíše podobné mnou naměřenými minimálními hodnotami, které se pohybovaly v rozmezí 39,40 – 51,50 %.

U hemoglobinu při kontrole podobnosti před pokusem (Tab. 7) byla potvrzena shoda ($p = 0,1007$). Testováním po pokusu v Tab. 8 byl potvrzen rozdíl ($p = 0,0001$) a následně Tab. 9 ukazuje, že rozdíly nastaly současně ve skupině 3 ($p = 0,00746$) a ve skupině 1 ($p = 0,00217$). Tento fakt tedy znemožňuje s určitostí potvrdit, že mono – dieta hovězího masa měla vliv na změny u hemoglobinu. K těmto změnám, zejména u kontrolní skupiny 1, mohlo dojít vlivem neznámého faktoru během pokusu. Mohu se pouze domnívat, zda vzniklý rozdíl

u skupiny 3 byl ovlivněn odlišnou dietou či nikoli, zda tento rozdíl souvisí či nesouvisí se změnou u skupiny 1. Popisné statistické charakteristiky z pokusu (Tab. 14 a 15) se pohybovaly v rozmezí 14,72 – 17,20 g/100 ml. Stanovení hemoglobinu je další parametr uvedený u mnoha autorů. Feldman et al. (2000) uvádí celkem úzké rozmezí nižších hodnot 11,50 – 15,60 g/100 ml. Mnou naměřené minimální hodnoty se nacházejí ve vyšším rozmezí 13,00 – 16,10 g/100 ml. Sayim et al. (2005) a Konrad et Bondy (1985) publikují široké rozmezí hemoglobinových hodnot, ve kterých se mé parametry ze začátku i konce pokusu nacházejí všechny. Sayim et al. (2005) publikuje 11,00 – 18,00 g/100 ml, s těmito čísly se shoduje i Wolfensohn et Lloyd (2003), a Konrad et Bondy (1985) uvádí 12,00 – 17,50 g/100 ml.

MCV neboli střední (průměrný) objem erytrocytu je poslední hematologický ukazatel, který byl v pokusu stanovován. Při kontrole podobnosti dat ze začátku pokusu (Tab. 7) byla potvrzena shoda ($p = 0,2499$), při kontrole podobnosti hodnot po pokusu (Tab. 8) byla ale potvrzena také shoda ($p = 0,2115$). Mohlo by se tedy mylně zdát, že nenastal žádný rozdíl v hodnotách MCV během pokusu a dieta neměla absolutně vliv na jakékoli změny. V poslední řadě se tedy testovala shodnost mezi skupinami před a po pokusu (Tab. 9), kde se nakonec vzniklé rozdíly potvrzují, dokonce u všech testovaných skupin, včetně kontrolní (skupina 1 $p = 0,00002$; skupina 2 $p = 0,00953$; skupina 3 $p = 0,00081$). Rozdíly v jednotlivých skupinách ale nastaly stejnou měrou, proto by závěr pouze z Tab. 8 mohl být chybný. Jelikož rozdíl nastal i v kontrolní skupině 1, kde by ke změně vlivem diety dojít vůbec nemělo, nelze tedy s určitostí potvrdit vliv mono – diety hovězího masa. Příčinou mohl být vliv neznámého faktoru během chovu jedinců, odběru vzorků aj. Stanovení MCV před pokusem (Tab. 16) se pohybovalo v rozmezích 65,60 – 68,10 fl a po pokusu (Tab. 17) byly hodnoty trochu nižší 62,63 – 64,38 fl. Feldman et al. (2000) publikuje širší rozmezí 55,40 – 70,40 fl. V jiných literaturách je MCV v různých intervalech, jako Sayim et al. (2005) uvádí rozmezí 50,00 – 65,00 fl, Moustafa (1997) publikuje hodnoty MCV mezi 48,00 – 51,00 fl a Khleifat et al. (2002) zase 56,00 – 66,00 fl.

6.2 Biochemické ukazatele

Mezi biochemická stanovení byla zařazena kyselina močová, triacylglyceroly, cholesterol a prvky hořčík a železo. Hodnotily se jednotlivé skupiny zvláště jako u hematologických ukazatelů, ale nastala chyba před pokusem během odběru krevních vzorků, jelikož bylo odebráno malé množství krve. Z tohoto důvodu byl vytvořen tzv. kontrolní souhrn před pokusem, skládající se z 10ti náhodně vybraných krevních vzorků z 30ti odběrů. Vzorky odebrané na konci pokusu jsou již rozděleny do tří skupin, podle plánu pokusu. Veškerá testování probíhala opět na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Prvním biochemickým ukazatelem byl triacylglycerol. Při testování podobnosti skupin po pokusu (Tab. 20) byl stanoven rozdíl ($p = 0,0036$). Podobnost před pokusem bohužel nebylo možné stanovit, jelikož nebylo k dispozici dostatek vzorků pro testování před pokusem. Mohu jen předpokládat, že by byl závěr shodný. Tedy vzniklý rozdíl po pokusu je doplněn Tab. 21, která nám vypovídá o pravděpodobnosti čistě náhodného případného rozdílu mezi hodnotami před a po pokusu. Vyplyvá z ní, že rozdíl nastal pouze u kontrolní skupiny 1 ($p = 0,0055$). Otázkou tedy je, jaké neznámé přičinění způsobilo změnu pouze v hodnotách kontrolní skupiny. Lze ovšem vyvrátit případný vliv změny diety, jelikož v této skupině k žádné změně v krmení během celé doby pokusu nedošlo. Vzhledem k tomu, že rozdíl nenastal u skupiny 3, která byla krmena mono – dietou hovězího masa, lze potvrdit, že na hodnoty TAG zjevně neměla změna krmiva vliv. Průměrná souhrnná hodnota TAG před pokusem (Tab. 22) byla 0,97 mmol/l. Průměrné hodnoty po pokusu (Tab. 23) se pohybovaly v rozmezí 0,87 – 1,54 mmol/l. Ney et al. (1991) zkoumal účinky různých diet (kukuřičný olej, mléčný tuk, hovězí lůj, palmový olej a kokosový olej) u samic potkanů kmene S-D. Jeho hodnota stanovená před pokusem se v podstatě shodovala s mým výsledkem, naměřil $0,98 \pm 0,07$ mmol/l. Po pokusu, trvajícím 6 týdnů, bylo nejvíc naměřeno u skupiny s hovězím lojem $1,14 \pm 0,10$ mmol/l, v jeho případě ovšem rozdíl byl signifikantní, na rozdíl od mého pokusu. U skupiny s přidavkem palmového oleje naměřil $1,02 \pm 0,06$ mmol/l, u kokosového oleje byla hodnota $1,02 \pm 0,03$ mmol/l, mléčný tuk $0,92 \pm 0,08$ mmol/l a u skupiny s kukuřičným olejem byla hodnota kolem $0,76 \pm 0,05$ mmol/l. Hosomi et al. (2013) zkoumal účinky rybí bílkoviny

v kombinaci s rybím olejem na metabolismus lipidů u potkanů. Mimo jiné stanovoval TAG v plasmě, který po 4 týdnech pokusu vyšel 1,83 mmol/l. Podle jeho tvrzení došlo ke snížení obsahu TAG v krvi díky tomuto výživovému experimentu a považuje tento výsledek za příznivý v prevenci onemocnění souvisejících s životním stylem.

Dalším testovaným ukazatelem byl cholesterol. Situace s testováním podobnosti před pokusem je stejná jako u TAG. Při testování podobnosti skupin po pokusu potvrzuje Tab. 20 rozdíl ($p = 0,0004$). Tab. 21 doplňuje, že rozdíl vznikl ve všech skupinách (skupina 1 $p = 0,0029$; skupina 2 $p = 0,000007$; skupina 3 $p = 0,0000003$). Vzhledem k tomu, že ve skupině 3 nastal rozdíl největší, lze předpokládat, že mono – dieta hovězího masa k tomuto závěru také přispěla, ovšem nelze vyvrátit také vliv dalších nedefinovaných okolností či neznámých faktorů, které mohly současně ovlivnit také zbylé dvě skupiny. Souhrnné hodnoty před pokusem byly stanoveny na průměr 1,29 mmol/l, ale po ukončení pokusu se tato hodnota zvýšila na rozmezí 1,75 – 2,46 mmol/l (Tab. 24 a 25). Lynch et al. (1991) prováděli podobný výživový pokus na jehňatech, shodného věku a váhy, která byla rozdělena do tří skupin a každá byla ad libitum krmena odlišnou dietou (sojová mouka, řepkový šrot a celá semena řepky). Zkoumali zejména složení mastných kyselin a obsah cholesterolu ve svalovině a tukové tkáni. Stejně jako v mém provedeném pokusu, i u jehňat byl zaznamenán vliv odlišné diety, konkrétně cholesterol byl nejvyšší u jehňat krmených sojovou moukou. Ney et al. (1991) ovšem domněnku zvyšující se hladiny cholesterolu vlivem různých diet vyvrací. V jeho pokusu na potkanech (viz zmínka u TAG) docházelo během pokusu ke snižování hladiny, tedy vliv diety byl, ale klesajícího rázu. Tento autor před pokusem naměřil $3,22 \pm 0,10$ mmol/l, což je skoro dvojnásobné množství oproti mnou zmiňované hodnotě před pokusem. Po pokusu byl cholesterol nejvíce naměřen u skupiny s přidavkem palmového oleje $2,62 \pm 0,11$ mmol/l nebo u jedinců s hovězím lojem $2,51 \pm 0,11$ mmol/l. Další výsledné hodnoty byly $2,45 \pm 0,11$ mmol/l u kukuřičného oleje, dále $2,30 \pm 0,09$ mmol/l u kokosového oleje a $2,18 \pm 0,10$ mmol/l u mléčného tuku. Všechna tato data jsou stále mnohem vyšší než mnou naměřené hodnoty. Hosomi et al. (2013) se také zabýval vlivem rybích proteinů a rybího oleje na hladinu cholesterolu (viz. zmínka u TAG). Ten během pokusu stanovil na 3,55 mmol/l. Podle jeho závěru i u cholesterolu došlo k jeho snížení nejen v krvi. Tyto výsledky tedy podle autora

naznačují, že kombinovaný příjem rybích proteinů a rybího oleje mohou hrát pozitivní roli v prevenci onemocnění souvisejících s konzumací ryb jako jediným zdrojem bílkovin.

Dalším ukazatelem v řadě je kyselina močová. Tab. 20 potvrzuje shodnost hodnot po pokusu ($p = 0,8792$). Následně Tab. 21 ukazuje, že shodnost byla u všech tří skupin před a po pokusu (skupina 1 $p = 0,8365$; skupina 2 $p = 0,8672$; skupina 3 $p = 0,5666$), z čehož lze tedy vyvodit závěr, že mono – dieta hovězího masa neměla vliv na hodnoty kys. močové. Souhrnná hodnota před pokusem (Tab. 26) byla $166,45 \mu\text{mol/l}$. Průměrné hodnoty po pokusu (Tab. 27) byly stanoveny v rozmezí $150,90 - 162,31 \mu\text{mol/l}$. Tento závěr z pokusu mě trochu překvapil, jelikož jsem předpokládala, že u skupiny 3 nastane rozdíl, vzhledem k masité mono – dietě. Je známo, že kys. močová vzniká při metabolismu purinů, jejichž množství v těle kolísá podle příjmu potravy. Oliveira et Burini (2012) uvádějí, že vysoká hladina kys. močové v plasmě je rizikovým faktorem pro dnu, ledvinové kameny či kardiovaskulární onemocnění a přímo koreluje se syntézou TAG v játrech. Také uvádějí, že hladina kys. močové v těle narůstá při vysokém příjmu fruktózy, alkoholu ad. Nakagawa et al. (2006) studoval právě vliv fruktózy na zvyšování hladiny kys. močové. Během pokusu byli potkani (SD) rozděleni do skupin: kontrolní skupina krmena bez fruktózy, skupina 2 krmena přídatkem fruktózy a skupina 3 s fruktózou v potravě, ale zároveň se jim do pitné vody přidával lék allopurinol (blokátor tvorby kys. močové). Po 10ti týdnech pokusu byla stanovena mimo jiné hladina kys. močové v plasmě, která byla u kontrolní skupiny v rozmezí $59,48 - 71,38 \mu\text{mol/l}$, skupina s fruktózou a lékem měla ještě nižší rozmezí $47,58 - 59,48 \mu\text{mol/l}$ a skupina s fruktózou dosahovala rozmezí $95,17 - 107,01 \mu\text{mol/l}$. Mé hodnoty jsou ovšem nesrovnatelně vyšší i před zahájením pokusu. Amin et Nagy (2009) provedli pokus týkající se obezity a diabetes II. typu. Vytvořili výživový pokus na potkanech (vysoký obsah tuku a přídavek karnitinu), který stanovoval také kys. močovou. Jejich kontrolní skupina měla stanovené rozmezí hodnot $134,43 - 142,75 \mu\text{mol/l}$, mé hodnoty u kontrolní skupiny jsou o něco vyšší. Hodnoty po pokusu jsou zase z mého pokusu nižší, jelikož autoři Amin et Nagy (2009) stanovili u skupiny s vyšším obsahem tuku rozmezí $347,36 - 356,88 \mu\text{mol/l}$ a u skupiny tuk + karnitin rozmezí $289,67 - 297,99 \mu\text{mol/l}$. Drewa et al. (2007) se zase zabýval zvyšování se kys. močové při podávání léku Ambroxol (proti zánětu sliznice dýchacích cest a nosohltanu). Tento lék jako vedlejší účinek způsobuje zvýšení hladiny kys. močové a tím

vznik močových kamenů. Po provedeném pokusu s tímto lékem se mimořádně zvýšila hladina kys. močové na rozmezí 457,99 – 576,96 $\mu\text{mol/l}$. Po vysazení se data snížila na původní hodnoty, odpovídající i kontrolní skupině (bez léku) 279,56 – 398,52 $\mu\text{mol/l}$. Ovšem i toto rozmezí dat je vyšší než mou naměřené.

Předposledním biochemickým ukazatelem je makroprvek hořčík. Z Tab. 20 vyplývá, že hodnoty po pokusu byly shodné ($p = 0,4927$). Následně Tab. 21 ukazuje, že při porovnání dat před pokusem a po pokusu nastala velká rozdílnost a to u všech tří skupin (skupina 1 $p = 0,000000018$; skupina 2 $p = 0,0000024$; skupina 3 $p = 0,0000000025$). Je otázkou, jestli takto velký rozdíl má souvislost s neznalostí podobnosti dat před pokusem, které jako v případě hematokritu možná byly také rozdílné již před zahájením vlastního experimentu. Rozhodně nelze jednoznačně říct, zda měla změna diety vliv či nikoli. Mohu se domnívat, že odlišná krmná dávka u jedinců mohla jistým způsobem přispět ke změnám v hodnotách, ale nejspíš došlo ještě k jiným neznámým vlivům, které se týkaly všech skupin, a proto je tak výrazně ovlivnily. Průměrná souhrnná hodnota před pokusem (Tab. 28) u Mg byla 0,66 mmol/l. Průměrné naměřené hodnoty po pokusu (Tab. 29) byly v rozmezí 1,30 – 1,37 mmol/l. Carney et al. (1980) se věnoval problematice nedostatku Mg u potkanů. Podle jeho výzkumu dochází u jedince s deficitem v dietě k šetření tímto prvkem v těle, nedochází k jeho vylučování močí a je tedy maximálně zvýšená reabsorbce v ledvinách. Jak popisuje Wilhelm et al. (2005), hořčík je druhým nejdůležitějším kationtem pro organismus, proto vytvořil studii, ve které zkoumal Mg u potkanů v krvi a ve tkáních. Zvířata byla rozdělena podle pohlaví a samci navíc ještě podle věku (10 – 12 týdnů vs. 22 – 24 týdnů). Stanovená hodnota u samic byla $0,73 \pm 0,11$ mmol/l, u mladších samců $0,65 \pm 0,04$ mmol/l a u starších samců $0,64 \pm 0,05$ mmol/l. Zejména hodnoty samců se shodují s mnou stanovenou hodnotou před pokusem. Hsu et al. (1982) studoval účinky Mg na metabolismus a na glutation u dvou skupin potkanů (kontrolní skupina krmena s 662 ppm Mg a skupina s deficitem, pouze 12 ppm Mg v potravě). Pokus povrdil, že je Mg nezbytný pro udržování koncentrace glutationu proti oxidačnímu poškození membrány erytrocytů. Jeho stanovená hodnota u kontrolní skupiny byla $1,99 \pm 0,26$ mmol/l a u skupiny s deficitem $0,72 \pm 0,12$ mmol/l, která se ovšem více shoduje mnou naměřenou hodnotou před pokusem. Elin et al. (1980) se také zabýval deficitem hořčíku v dietě u potkanů kmene (F) a jeho dopad zejména na erytrocyty. Zkoumal

životnost červených krvinek a kvalitu jejich membrány. Pozoroval, že při nedostatku Mg dochází k abnormalitám na membránách erytrocytů a zkracuje se jejich životnost. „Čerstvé“ krvinky byly v morfologii membrány podobné jako u erytrocytů kontrolní skupiny, krmnou vyváženě, ale studie prokázala, že ve skupině s deficitem Mg v dietě se rychle rozvíjí biochemické a morfologické abnormality na membránách erytrocytů a tedy jejich rychlejší zánik. Další autor věnující se hypomagnesii je Weglicki et al. (2010), který spojuje nedostatek tohoto makroprvku nejen s ovlivněním krevních buněk, ale také dochází k poruchám srdečního rytmu, křeče v končetinách či negativní působení na střevní tkáň, kde následně dochází k zánětlivým reakcím.

Analýza posledního ukazatele, mikroprvku železa (Fe), byla stanovena pouze po ukončení pokusu (Tab. 20), kde byl naměřen rozdíl ($p = 0,0393$), ale nelze je tedy srovnat s kontrolními parametry a učinit tak závěr vlivu odlišné diety. Dá se jen očekávat, že Fe nebude výrazně ovlivněno takto krátkodobě stanovenou mono – dietou, nebo naopak by rozdíl nastal. Při stanovení průměrných hodnot po pokusu (Tab. 30) vyšlo široké rozmezí 61,33 – 104,61 $\mu\text{mol/l}$. Otázka železa v krvi je často studované téma. Zabývají se jeho deficitem v organismu a způsobenými následky. Ranganathan et al. (2011) provedl výživový pokus s prvky železa a mědi. Jednotlivé skupiny dostaly do totožné dávky různé množství zkoumaného prvku. Konkrétně u Fe byla u kontrolní skupiny (200 ppm Fe) stanovena krevní hodnota 20,77 $\mu\text{mol/l}$. U skupiny s deficitem Fe v krmné dávce ($\text{Fe} < 9 \text{ ppm}$) bylo stanoveno dokonce jen 1,93 $\mu\text{mol/l}$. O to více mě mrzí, že nejsou k dispozici hodnoty před zahájením mého pokusu, jelikož také mohl nastat výraznější rozdíl, ať už zvýšení či snížení hodnoty. Gambling et al. (2003) se zabýval mírným deficitem v graviditě. Uvádí, že pokud má samice během březosti nedostatek tohoto prvku, dojde ke změnám nejen v hematologických parametrech jí samotné, ale také dochází k ovlivnění jejího potomstva, u kterých se deficit Fe matky projevil zejména nárůstem krevního tlaku, bez ohledu na pohlaví. Dále byla ovlivněna tělesná hmotnost potomků, konkrétně jejich nižší porodní váha. Deficit Fe souvisí i s anémií, kterou studoval Crowe et al. (1995) ve výživovém experimentu. V jeho pokusu byly samice kmene (SD) rozděleny na skupinu krmnou běžnou KS pro potkany a skupinu krmnou speciálně upravenou dietou s nízkým obsahem železa ($\text{Fe} < 6 \text{ ppm}$). U těchto samic se sledoval hemoglobin, ale hlavní výzkum spočíval v jejich potomstvu. Chudokrevná mláďata měla nižší systolický krevní tlak než u kontrolní skupiny a dále bylo prokázáno, že u samic po

porodu byl naměřen výraznější vzestup systolického krevního tlaku, souvisejícího právě s jejich mateřskou anémií.

7 Závěr

Výsledky pokusu částečně potvrzují, že mono – dieta hovězího masa může mít vliv na hematologické a biochemické ukazatele. Tento závěr lze potvrdit s 95% pravděpodobností, ale jako u všech jiných pokusů, i zde se musí počítat s možnými chybami jako např. při odběru krevních vzorků aj.

Hematologické testování a následné zpracování hodnot v jistých případech vliv změny diety potvrdily, konkrétně u počtu erytrocytů. V případě hemoglobinu a MCV nelze s určitostí potvrdit ale ani vyvrátit vliv odlišné diety. Jelikož bylo ovlivněno více skupin, nejen skupina 3 krmena výhradně hovězím masem, ale také zejména kontrolní skupina 1, u které během pokusu k žádné změně v krmění nedošlo, lze pouze vliv diety jistou měrou předpokládat, ale současně počítat i s jinými sekundárními faktory ovlivňující hodnoty pokusu.

Biochemická analýza byla znevýhodněna malým množstvím odebrané krve, ze které nebylo možné vytvořit rozdělení vzorků na pomyslné tři skupiny dle plánu pokusu. Proto vytvořený souhrn 10ti vzorků, společný pro všechny 3 skupiny před pokusem, může jistým způsobem naznačovat pochybnosti o relevantnosti výsledků. I přes tyto počáteční nesnáze se lze u některých biochemických ukazatelů domnívat, že mono – dieta hovězího masa může mít vliv na jejich zastoupení v krvi jedince. Například u cholesterolu lze jistou měrou předpokládat, že odlišná dieta u potkanů má na tento parametr vliv. Ale jelikož byla ovlivněna i kontrolní skupina, nelze vyvrátit i jiné neznámé faktory zasahující do průběhu pokusu. Tento stejný závěr lze aplikovat i na makroprvek hořčíku, u kterého také nelze s jistotou vyvrátit vliv změny krmné dávky u jedinců, ale také i zde musíme brát v ohled nedefinované vlivy, které se mohly týkat všech skupin současně a ovlivnit jejich výsledky. U TAG a kys. močové lze vyvrátit hypotézu, z čehož lze předpokládat, že mono – dieta neměla vliv na výsledky. U prvku železa nelze ani odhadnout možný vliv odlišné diety u skupin, jelikož nebyly k dispozici ani souhrnné hodnoty, se kterými by se dalo jistou měrou porovnávat vzniklý rozdíl po pokusu. Domnívám se, že by mono – dieta u jedinců vliv na zastoupení železa určitě měla, jelikož je to v organismu velice potřebný prvek.

Výsledky pokusu tedy úplně nepotvrdily, ale ani nevyvrátily stanovenou hypotézu. Závěrem je určitá závislost diety na některé hematologické a biochemické ukazatele, které by jistě vyšly průkazněji, kdyby byla delší doba pokusu, větší počet zkoumaných potkanů a tím i větší počet testovaných krevních vzorků. Jistě by bylo zajímavé pokus také rozšířit i o jiné krevní ukazatele, jakými jsou např. leukocyty, jaký vliv by měla odlišná mono – dieta na jejich počet a na celkový imunitní systém. Z biochemických ukazatelů by se mohla stanovit navíc glukóza či celková bílkovina.

8 Použitá literatura

Amin, K. A., Nagy, M. A. 2009. Effect of carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *BioMed Central*. 1: 17.

Anděra, M., Horáček, I. 2005. *Poznáváme naše savce*. Praha, 2. vydání. ISBN: 80-86817-08-3.

Andrews, E. J., Bennett, B. T., Clark, J. D., Houpt, K. A., Pascoe, P. J., Robinson, G. W., Boyce, J. R. 1993. 1993 report of the AVMA panel on euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202:229-249.

Argent, N. B., Liles, J., Rodham, D., Clayton, C. B., Wilkinson, R., Baylis, P. H. 1994. A new method for measuring the blood volume of the rat using ¹¹³m Indium as a tracer. *Laboratory Animals*. 28 (2). 172-175.

Archer, R. K., Riley, J. 1981. Standardized methods for bleeding rats. *Lab Anim*. 15:25-28.

Belcher, E. H., Harriss, E. B. 1957. Studies of plasma volume, red cell volume and total blood volume in young growing rats. *J. Physiol* 14. 64-78.

Bienertová Vašků, J., Bučková, D., Izakovičová Holá, L., Jurajda, M., Kaňková, K., Kuchtíčková, Š., Pacál, L., Vašků, A., Znojil, V. 2007 *Praktikum z patologické fyziologie* [online]. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. [cit. 2015-03-06]. Dostupné z: <<http://is.muni.cz/elportal/?id. ISSN 1802-128X>.

Carney, S. L., Wong, N. L., Quamme, G. A., Dirks, J. H. 1980. Effect of magnesium deficiency on renal magnesium and calcium transport in the rat. *J. Clin. Invest.* 65(1): 180-188.

Conybeare, G., Leslie, G. B., Angles, K., Barrett, R. J., Luke, J. S. H., Gask, D. R. 1988. An improved simple technique for the collection of blood samples from rats and mice. *Lab Anim*. 22:177-182.

Crowe, C., Dandeka, R. P., Fox, M., Dhingra, K., Bennet, L., Hanson, M. A. 1995. The effects of anaemia on heart, placenta and body weight, and blood pressure in fetal and neonatal rats. *J. Physiol* October 15. 488 (Pt 2) 515-519.

- Development core team.** 2008. A language and environment of statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. Austria. ISBN: 3-900051-07-0.
- Doubek, J. et al.** 2003. Veterinární hematologie. 1. vyd. Noviko a.s. Brno. 464 s. ISBN: 80-86542-02-5.
- Drewa, T., Wolski, Z., Gruszka, M., Misterek, B., Lysik, J.** 2007. Uric acid plasma level and urine pH in rats treated with abroxol. Acta Poloniae Pharmaceutica. Vol. 64 no. 6. 565-567.
- Elin, R. J., Utter, A., Tan, H. K., Corash, L.** 1980. Effect of magnesium deficiency on erythrocyte aging in rats. Am. J. Pathol. 100(3): 765-778.
- Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, N. C.** 2000. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 5th ed. 1344 p. ISBN: 0-683-30692-8.
- Figala, J.** 1965. Differences in the rhythm of activity in black rats (*Rattus rattus*) and Brown rats (*Rattus norvegicus*). Acta soc. zool. Bohemoslov., 29: 70-84.
- Gambling, L., Dunford, S., Wallace, D. I., Zuur, G., Solanky, N., Srari, S. K., Mcardle, H. J.** 2003. Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. J. Physiol. 603-610.
- Godwin, K. O.** 1964. Hematological observations on healthy (SPF) rats. Br. J. Exp. Pathol. 45: 514.
- Harkness, J. E., Wagner, J. E.** 1995. The biology and medicine of rabbits and rodents. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hau, J., Schapiro, S. J.** 2011. Handbook of laboratory animal science, Volume 1. Essential principles and practices. Taylor and Francis Group, LLC. 3th ed. ISBN: 978-1-4200-8455-9.
- Hosomi, R., Fukunaga, K., Arai, H., Kanda, S., Nishiyama, T., Yoshida, M.** 2013. Effect of combination of dietary fish protein and fish oil on lipid metabolism in rats. J. Food. Sci. Technol. 50(2): 266-274.
- Hsu, J. M., Rubenstein, B., Paleker, A. G.** 1982. Role of magnesium in glutathione metabolism of rat erythrocytes. J. Nutr. 112(3): 488-96.

Jebavý, L., Dynterová, A., Jebavý, M., Jelínek, F., Krejčí, J. V., Louda, F., Marhan, O., Matoušek, V., Svobodová, I., Špelda, S. 2011. Chov laboratorních zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze. 210 s. ISBN: 978-80-213-2176-2.

Jelínek, P., Koudela, K. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. ISBN: 80-7157-644-1.

Jiran, E. 1994. Směrné hodnoty důležitých laboratorních vyšetření pro domácí zvířata. Vetpres Jílové u Prahy. 127 s.

Kendíková, I., Vítková, D. 2004. Více o morčatech a laboratorních potkanech. Základní organizace chovatelů morčat a jiných drobných hlodavců. Praha. 36 s.

Khleifat, K., Shakhanbeh, J., Tarawneh, K. 2002. The chronic effects of Teucrium polium on some blood parameters and histopathology of liver and kidney in the rat. Turk. J. Biol. 26: 65-71.

Knotková, Z., Knotek, Z. 2000. Drobní savci, fyziologické hodnoty, léky a jejich dávkování. Noviko a. s. Brno. 69 s. ISBN: 80-902676-3-7.

Konrád, J., Bondy, R. 1985. Choroby malých zvířat. 4. díl. 1. vydání. SPN Praha. 164 s.

Kuhn, G., Hardegg, W. 1991. Quantitative studies of haematological values in longterm ovariectomized, ovariohysterectomized and hysterectomized rats. Lab. Anim. 25: 40-45.

Lee, H. B., Blaufox, M. D. 1985. Blood volume in the rat. J. Nucl. Med. 26. 72-76.

Lynch, G. P., Norton S., Paroczay E., Solomon M. B. 1991. Influence of rapeseed meal, whole rapeseed, and soybean meal on fatty acid composition and cholesterol content of muscle and adipose tissue from ram lambs. Journal of Animal Science. 69 (10). 4055-4061.

Mitruka, B. J., Rawnsley, H. M. 1981. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans. 2nd ed. New York: Masson.

Moore, D. M. Rats. In: Rollin, B. E., Kessel, M. L., eds. The experimental animal in biomedical research. Boca Raton. FL: CRC Press. 1995. 2.

- Moore, D. M.** 2000. The animal medicine and science – Series II. University of Washington. Health Science. Center for Educational Resources. Seattle 23 s. SBN: 1-55910-051-6.
- Moustafa, S. A.** 1997. Age – dependent changes in haematology and clinical chemistry parameters in the rat. *Biomedical Letters*. 55: 83-90.
- Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K. R., Short, R. A., Glushakova, O., Ouyang, X., Feig, D. I., Block, E. R., Herrera-Acosta, J., Patel, J. M., Johnson, R. J.** 2006. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *American Journal of Physiology*. Vol 290. no 3. 625-631.
- Nejedlý, K.** 1967. *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat*. Praha. 636 s. 16-907-67.
- Ney, D. M., Lai, H. C., Lasekan, J. B., Lefevre, M.** 1991. Interrelationship of plasma triglycerides and HDL size and composition in rats fed different dietary saturated fats. *J. Nutr.* 121(9): 1311-22.
- Oliveira, E. P., Burini, R. C.** 2012. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetol Metab Syndr.* 4: 12.
- Pass, D., Freeth, W.** 1993. *The Rat*. The University of Adelaide. Australia. Anzcart news. Vol 6. No 4.
- Pelikán, J., Gaisler, J., Rödl, P.** 1979. *Naši savci*. Academia. Praha. 163 s.
- Procházková, J.** 2009. *Struktura prostředí a welfare laboratorních potkanů*. Bakalářská práce. ČZU Praha.
- Ranganathan, P. N., Lu, Y., Jiang, L., Kim, Ch., Collins, J. F.** 2011. Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron – deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. *Journal List Blood*. 118(11): 3146-3153.
- Razali, N., Wah, Y. B.** 2011. Power comparisons of Shapiro – Wilk, Kolmogorov – Smirnov, Lilliefors and Anderson – Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 2 (1): 21-33.

- Reece, W. O.** 1998. Fyziologie domácích zvířat. Grada Publishing, spol. s. r. o. Praha. 456 s. ISBN: 80-7169-547-5.
- Ringler, D. H., Dabich, L.** 1979. Hematology and clinical chemistry. In: Baker, H. J. et al. The laboratory rat. New York: Academic Press. 1.
- Sayim, F., Yavasoglu, N. F. K., Uyanikgil, Y., Aktug, H., Yavasoglu, A., Turgut, M.** 2005. Neurotoxic effects of cypermethrin in Wistar rats : a haematological, biochemical and histopatology study. Journal of Health Science. 51 (3): 300-307.
- Scipioni, R. L., Diters, R. W., Myers, W. R., Hart, S. M.** 1997. Clinical and clinicopathological assessment of serial phlebotomy in the Sprague Dawley rat. Lab. Anim. Sci. 47: 293-299.
- Schermer, S.** 1967. The blood morphology of laboratory animals. Philadelphia. FA Davis.
- Smustad, D. P., Simmons, M. J.** 2009. Genetika. 5. vyd. Masarykova univerzita. ISBN: 978-80-210-4852-2.
- Steinbach, G.** 1999. Životní prostředí. Ikar Praha. ISBN: 80-7202-503-1.
- Šilhavý, J.** 2006. Kontaminace kmenů laboratorního potkana roupem (*Syphacis spp.*) a sledování vybraných hematologických a biochemických ukazatelů v souvislosti se zdravotním stavem pokusných zvířat. Diplomová práce. ČZU Praha
- Štern, P.** 2005. Obecná a klinická biochemie. Karolinum. Praha. ISBN: 80-246-1025-6.
- Toman, M. et al.** 2009. Veterinární imunologie. Grada Publishing s.r.o. Praha. 392 s. ISBN: 978-80-247-2464-5.
- Velenská, N.** 2007. Hlodavci. Robimachus. Rudná u Prahy. 167 s. ISBN: 978-80-903-3572-1.
- Velíšek, J., Hajšlová, J.** 2009. Chemie potravin 1. OSSIS. Havlíčkův Brod. 602 s. ISBN: 978-80-86659-15-2.
- Vlasák, P.** 2006. Ekologie savců. Academia. Praha. 291 s.
- Weglicki, W. B., Mak, I. T., Chmielinska, J. J., Tejero – Taldo, M. I., Komara, A., Kramer, J. H.** 2010. The role of magnesium deficiency in cardiovascular and intestinal inflammation. Magnes Res. 23(4): 199-206.

Wilhelm, Z., Pechová, A., Scheer, P., Kleinová, J., Roubalíková, L. 2005. Serum and tissue concentrations of magnesium, calcium, potassium and sodium in rats. Acta Vet Brno. 74: 183-190.

Wolfensohn, S., Lloyd, M. 2003. Handbook of laboratory animal; Management and Welfare. Blackwell Publishing Ltd. 3 ed. ISBN: 1-4051-1159-3.

Zejda, J., Zapletal, M., Pikula, J., Obdržálková, D., Heroldová, M., Hubálek, Z. 2002. Hlodavci v zemědělské a lesnické praxi. Agrospoj s. r. o. Praha. 284 s. ISBN: 80-7084-235-0.

Zima, T., Kazda, A., Průša, R., Štern, P. 2013. Laboratorní diagnostika. Galén. Praha. 3. vydání. 1146 s. ISBN: 978-80-7492-062-2.

Živná, H. 2001. Základy práce s potkanem v laboratoři. Sochlichte. Hradec Králové. 59 s. ISBN: 80-238-7761-5

9 Seznam zkratek a symbolů:

α	hladina významnosti
ATP	adenosintrifosfát
F	kmen Fisher
Fe	mikroprvek železo
Hb	hemoglobin
Ht	hematokrit
LE	kmen Long-Evans
MCV	střední objem erytrocytu (mean cell volume)
Mg	makroprvek hořčík
p	pravděpodobnost
PCV	(packed cell volume)
ppm	parts per million
RBC	erytrocyty (red blood cells)
RHS	retikulohistiocytární systém
SD	kmen Sprague-Dawley
TAG	triacylglycerol
W	kmen Wistar
WBC	leukocyty (white blood cells)
ž. hm.	živá hmotnost

10 Přílohy

Příloha 1 Chovné prostředí

Foto 1 – standardní chovné nádoby

Foto 2 – detail horního víka chovné nádoby

Příloha 2 Laboratorní potkan kmene Wistar

Foto 3

Foto 4



Foto 1 – Standardní chovné nádoby (Procházková, 2009)



Foto 2 – Detail horního víka chovné nádoby s krmítkem a napáječkou (Procházková, 2009)



Foto 3 – Laboratorní potkan kmene Wistar (procházková, 2009)



Foto 4 – Obsazení chovných nádob po dvou jedincích (Procházková, 2009)