

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015

ELIŠKA STROUHALOVÁ



**Vliv polynenasycených mastných kyselin n-3 na expresi
vybraného genu u modelového organismu**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

Vypracovala:

Bc. Eliška Strouhalová

Zadání

Čestné prohlášení

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

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych především ráda poděkovala prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc. za odborné vedení a cenné rady při řešení méj diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Ondreji Škultétymu za pomoc s molekulárně-biologickými metodami, Ing. Veronice Rozíkové, Ph.D. za vedení krmného pokusu a ostatním, kteří na celém experimentu Vliv kyseliny dokosaheptaenové na markery zánětu u modelového organismu spolupracovali.

Také děkuji Interní grantové agentuře AF MENDELU za poskytnuté finanční prostředky k řešení projektu č. TP 3/2014.

ABSTRAKT

Cílem mojí diplomové práce bylo zhodnotit vliv polynenasycených mastných kyselin n-3 (DHA a EPA) na expresi genů, hl. *PPAR* γ , u modelového organismu. Tyto polyne-nasycené mastné kyseliny zvyšují expresi genu *PPAR* γ , a tím snižují riziko rozvoje zánětu a aterosklerózy. Tato hypotéza byla testována na 40 pokusných potkanech (*Wistar albino*), kteří byli v prvních 7 týdnech krmení dietou s přídavkem hovězího loje a slazeného kondenzovaného mléka, dokud u nich nebylo dosaženo vzniku mírné obezity a zánětu. V dalších 7 týdnech byli rozdělení do 4 skupin po 10 potkanech, jedna skupina zůstala na dietě s hovězím lojem (konrolní skupina), další skupiny dostávaly dietu s 6% přídavkem oleje ze světlice barvířské, 6% přídavkem rybího oleje (vysoký obsah EPA) nebo 6% přídavkem oleje řasy *Schizochytrium* (vysoký obsah DHA). Na konci pokusu byla pomocí molekulárně-biologických metod změřena exprese genu *PPAR* γ . Bylo prokázáno, že strava bohatá na DHA zvyšuje expresi genu *PPAR* γ ($P < 0,05$). U diety s obsahem rybího oleje nebylo zvýšení exprese genu *PPAR* γ průkazné ($P > 0,05$). Tím jsme potvrdili hypotézu, že strava bohatá na PUFA n-3 snižuje riziko vzniku zánětu a aterosklerózy, a že DHA je v tomhle ohledu prokazatelně lepší než EPA.

Klíčová slova

PUFA n-3, EPA, DHA, ateroskleróza, exprese genů, *PPAR* γ

ABSTRACT

The aim of my thesis was to assess the influence of polyunsaturated fatty acids n-3 (DHA and EPA) on gene expression, mainly *PPAR* γ , in model organism. The expression of *PPAR* γ gene is increased by these polyunsaturated fatty acids and thus they decrease the risk of development of inflammation and atherosclerosis. This hypothesis was tested on 40 test rats (*Wistar albino*). The first 7 weeks the rats were fed with a diet containing beef tallow and sweet condensed milk until they manifested mild obesity and inflammation. During other 7 weeks they were divided into 4 groups, each containing 10 individuals. One of the groups was further fed with diet containing beef tallow (control group), other groups received diet with 6% content of oil from safflower added, 6% content of fish oil (high content of EPA) or 6% content of oil from *Schizochytrium* alga (high content of DHA). The expression of *PPAR* γ was measured by using molecular-biology methods at the end of the trial. It was proven that the diet rich on DHA increas-

es *PPAR* γ gene expression ($P < 0,05$). The increase of *PPAR* γ gene expression in a diet containing fish oil was inconclusive ($P > 0,05$). With these results we confirmed the hypothesis that diet rich on PUFA n3 decreases the risk of inflammation development and atherosclerosis and that DHA is significantly more effective.

Keywords

PUFA n-3, EPA, DHA, atherosclerosis, gene expression, *PPAR* γ

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Lipidy a jejich klasifikace	11
3.2	Mastné kyseliny – struktura, klasifikace a funkce	11
3.2.1	Charakteristika nasycených MK	12
3.2.2	Charakteristika nenasycených MK	12
3.2.2.1	Charakteristika polynenasycených mastných kyselin n-6	14
3.2.2.2	Charakteristika polynenasycených mastných kyselin n-3	16
3.3	Efekt PUFA n-3 a n-6 na zdraví člověka	17
3.4	Zánět, vznik kardiovaskulárních onemocnění	19
3.4.1	Zánět	19
3.4.2	Kardiovaskulární onemocnění	20
3.4.3	Arterioskleróza	20
3.4.3.1	Arteriolskleróza	20
3.4.3.2	Mönckebergova arterioskleróza	20
3.4.3.3	Ateroskleróza	21
3.5	Vliv PUFA n-3 a n-6 na expresi genů	21
3.5.1	Genová exprese	22
3.5.2	Rodina PPAR, funkce PPAR γ	23
3.5.3	Gen pro receptor spřažený s G-proteinem (<i>GPR120</i>), jeho funkce	26
3.5.4	Adiponektin a jeho receptory AdipoR1 a AdipoR2	27
3.5.5	Gen pro jaderný faktor κ B (<i>NF-κB</i>)	29
3.5.6	Gen pro β -aktin (<i>ACTB</i>)	30
3.6	Analýza genové exprese pomocí metod molekulární biologie	30
3.6.1	Charakteristika reverzně-transkripční PCR (RT-PCR)	31
3.6.2	Charakteristika metody kvantitativní PCR (qPCR, real-time RT-PCR)	32
3.6.3	Metody hodnocení relativní kvantifikace	33
3.7	Extrakce lipidů	34
3.8	Plynová chromatografie mastných kyselin	34
4	MATERIÁL A METODIKA	35
4.1	Charakteristika krmného pokusu	35

4.2	Experimentální část.....	36
4.2.1	Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.....	37
4.2.2	Stanovení glykémie.....	38
4.2.3	Odběr vzorků pro expresi genů.....	38
4.2.4	Izolace RNA pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen).....	39
4.2.5	Kontrola izolace RNA pomocí gelové elektroforézy.....	40
4.2.6	Reverzní transkripce.....	41
4.2.7	Real-time PCR.....	42
4.2.8	Statistické analýzy.....	44
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
5.1	Průměrná spotřeba krmiva.....	45
5.2	Živá hmotnost potkanů, hmotnost jater a viscerální tukové tkáně.....	45
5.3	Stanovený obsah mastných kyselin v krmivu.....	48
5.4	Obsah mastných kyselin v tukové tkáni a játrech.....	50
5.5	Hodnoty glykémie.....	52
5.6	Expres vybraných genů.....	53
6	ZÁVĚR.....	58
	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....	60
	Internetové zdroje.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	67
	SEZNAM TABULEK.....	68
	SEZNAM ZKRATEK.....	69

1 ÚVOD

Lipidy jsou základní složky výživy člověka, které k životu potřebuje. K nim patří i polynenasycené mastné kyseliny. Jelikož si je savci, vč. člověka, neumí syntetizovat sami, musí je přijímat v potravě. Proto se tyto kyseliny nazývají esenciální. Nejdůležitějšími esenciálními polynenasycenými mastnými kyselinami jsou kyselina linolová (n-6) a α -linolenová (n-3), z kterých se pomocí chemických reakcí tvoří kyselina arachidonová (n-6) a kyseliny eikosapentaenová (EPA, n-3) a dokosahexaenová (DHA, n-3). Tyto kyseliny jsou důležité, jelikož jejich metabolity ovlivňují buněčné funkce, imunitní reakce a celkově zdraví organismu. Řady n-6 a n-3 si při vzniku jejich metabolitů přirozeně konkurují, a proto je důležitý jejich vzájemně vyvážený příjem. Pro pozitivní účinky na organismus je žádoucí poměr n-6/n-3 nižší než 4/1, v dnešní populaci se tento poměr vyšplhal až na 15/1. To má za následek negativní vlivy na organismus člověka, mezi které patří zvýšený rozvoj obezity, hyperglykémie, inzulínové rezistence nebo kardiovaskulárních onemocnění, vedoucích až k infarktu. Naproti tomu n-3 PUFA mají vesměs opačný efekt. Již při konzumaci EPA a DHA v množství 2 g na den dojde k výraznému zlepšení parametrů krve, snížení obsahu glukózy v plazmě a zlepšení stavu cévních stěn. Obecně mají PUFA n-3 významné protizánětlivé a protitrombotické vlastnosti. Dietární zdroje těchto látek představují především tučné ryby a mořští živočichové nebo rostliny.

Vztahy mezi genetickou informací (genomem, transkriptomem) a reakcí organismu na látky přijímané v potravě se zabývá moderní vědní obor nutrigenomika. Této problematice jsem se dotkla i já v mojí diplomové práci. V praktické části jsem se zaměřila na vyhodnocení vlivu EPA a DHA, přijímaného potravou, na expresi genu pro receptory aktivované proliferátory peroxizomů *PPAR γ* . DHA či EPA působí jako ligandy, jež po navázání na *PPAR γ* zvyšují jeho expresi, čímž dochází k modulaci protizánětlivých reakcí organismu.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Má diplomová práce byla součástí rozsáhlejšího experimentu Vliv kyseliny dokosahe-
xaenové na markery zánětu u modelového organismu.

Cílem mojí diplomové práce bylo:

1. Studium dostupné literatury shrnující působení kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahehexaenové (DHA) na expresi genů pro transkripční faktory, u nichž se předpokládá modulace jejich signálních drah vlivem EPA a DHA.
2. Spolupráce na technickém zajištění krmného pokusu s laboratorními potkany, kterým byly podávány oleje s vysokým obsahem EPA a DHA.
3. Provedení kvantifikace exprese vybraných genů metodou real-time PCR, seznámení se s touto metodou.
4. Vyhodnocení získaných výsledků vhodnými statistickými metodami a jejich následné zpracování formou diplomové práce.
5. Ověření potenciálu DHA jako nutriceutika schopného zabránit v dostatečně dlouhém časovém intervalu navození stavu mírného chronického zánětu v organismu, tj. funkce DHA snížit riziko vzniku aterosklerózy (kardiovaskulárního onemocnění) dietární intervencí. Ověření, že DHA je v tomto procesu účinnější než EPA.

Ve své DP zmiňuji i ostatní použité metody a jimi získané výsledky.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Lipidy a jejich klasifikace

Lipidy (z řeckého lipos = tučný), spolu se sacharidy a proteiny, patří mezi základní složky ve výživě člověka (HOLEČEK 2006). Jedná se o přírodní látky rostlinného nebo živočišného původu, které se mohou vyskytovat jak v kapalném, tak v pevném skupenství. Řadíme je k esterům vyšších karboxylových kyselin, které mohou být nasycené nebo nenasycené (FAHY A KOL. 2009). Lipidy jsou nepolární molekuly biologického původu (VOET A VOETOVÁ 1995), které oplývají částečnou nebo úplnou nerozpustností ve vodě a jsou velmi dobře rozpustné v organických rozpouštědlech – ether, chloroform, benzen. Povahou se může jednat o tuky, oleje, vosky či příbuzné sloučeniny (MURRAY A KOL. 2002). Lipidy jsou energeticky velmi bohaté sloučeniny (1 g tuku obsahuje 39 kJ = 9,3 kcal), a proto v živých organizmech často zastávají funkci jako zdroj a zásobárna energie. Význam lipidů je však mnohostranný (KERESTEŠ 2011). Tuky hrají významnou pozitivní i negativní roli ve výživě a zdraví člověka. Záleží hlavně na množství a složení přijatého tuku. Toto složení má významnou úlohu v prevenci řady onemocnění, hl. onemocnění srdce a cév (VRABLÍK 2008).

Lipidy nejčastěji klasifikujeme dle Bloorova na:

- a) jednoduché – tj. estery mastných kyselin s různými alkoholy
 - s glycerolem – tuky, oleje
 - s vyššími jednosytnými alkoholy – vosky
- b) složené
 - fosfolipidy
 - glykolipidy
 - sulfolipidy a aminolipidy
- c) prekurzory a odvozené lipidy – mastné kyseliny, glycerol, steroidy atd.

3.2 Mastné kyseliny – struktura, klasifikace a funkce

Mastné kyseliny (MK) se v přírodě mohou objevovat jako volné, tj. neesterifikované (HOLEČEK 2006) nebo estericky vázané v přírodních tucích a olejích (MURRAY A KOL. 2002). MK tvoří základní stavební kameny pro syntézu biologicky významných lipidů, včetně fosfolipidů, sfingolipidů nebo cholesterolu a jeho esterů. Jsou to prekurzory biologicky aktivních molekul tzv. eikosanoidů, např. prostaglandinů (WATKINS 2005).

Mastné kyseliny jsou molekuly tvořené alifatickými monokarboxylovými kyselinami s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Uhlovodíkový řetězec je složený většinou ze sudého počtu uhlíkových atomů (4 – 26 atomů, nejběžněji se vyskytuje 16 – 20 atomů uhlíku, VOET A VOETOVÁ 1995, VODRÁŽKA 1995). V současnosti existuje velké množství studií, které potvrzují významný vliv MK, hl. mononenasyčených a polynenasycených, na modulaci genové exprese. Čímž dochází k ovlivňování celkového lipidového metabolismu organismu (AFMAN A MÜLLER 2012).

Mastné kyseliny se rozdělují na (MURRAY A KOL. 2002):

- a) nasycené – neobsahují dvojnou vazbu
- b) nenasycené – obsahují jednu nebo více dvojných vazeb
 - monoenové (MUFA) – obsahují jednu dvojnou vazbu
 - polyenové (PUFA) – obsahují dvě a více dvojných vazeb

3.2.1 Charakteristika nasycených MK

Nasycené mastné kyseliny jsou většinou živočišného původu (GROFOVÁ 2007), nachází se v živočišných tucích, tj. máslo, sádlo nebo hovězí tuk (SVAČINA A KOL. 2008), výjimku tvoří nasycené mastné kyseliny obsažené v palmovém nebo kokosovém oleji (GROFOVÁ 2007). Nasycené MK slouží jako zdroj energie a tvoří důležitou součást buněčných membrán. Pro tělo mají negativní účinek, jelikož zvyšují hladinu cholesterolu v krvi. Mezi nejznámější nasycené MK patří palmitová či stearová (SVAČINA A KOL. 2008).

3.2.2 Charakteristika nenasycených MK

Nenasycené mastné kyseliny jsou převážně rostlinného původu, existují ovšem také výjimky – např. polynenasycené n-3 mastné kyseliny obsažené v rybách (GROFOVÁ 2007). Důsledkem přítomnosti dvojně vazby mohou nenasycené mastné kyseliny tvořit dva stereoizomery, podle orientace *cis* nebo *trans*. Toto uspořádání určuje fyzikálně-chemické vlastnosti dané kyseliny (HOLEČEK 2006). V přírodě se vyskytují většinou nenasycené mastné kyseliny, které obsahují *cis* dvojnou vazbu (MURRAY A KOL. 2002). *Trans*-MK se vyskytují v mikroorganismech, v semenech některých rostlin a u přežvýkavců, při β -oxidaci vznikají v malé míře i v lidském těle (HOLEČEK 2006).

Mononenasyčené MK obsahují jednu dvojnou vazbu na n-9 uhlíku (KIRK 1998). Tyto kyseliny jsou odvozené z kyseliny olejové a savci, vč. člověka, si je umí sami syn-

tetizovat (SIMOPOULOS 2005). Bohatým zdrojem těchto kyselin je olivový olej (KIRK 1998), avokádo a ořechy (KUNOVÁ 2004). Mezi známé mononenasyčené MK patří kyselina olejová (KIRK 1998), palmitolejová a eruková (MURRAY A KOL. 2002). Tyto MK snižují hladinu LDL-cholesterolu, tzv. zlého cholesterolu, který je pro tělo nebezpečný (SVAČINA A KOL. 2008), a zároveň zvyšují hladinu HDL-cholesterolu, tzv. hodného cholesterolu, který tělu prospívá (KUNOVÁ 2004). Účinně snižují riziko rozvoje srdečních onemocnění, rakoviny a zánětlivých onemocnění, mezi které patří i ateroskleróza (KIRK 1998).

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) obsahují více dvojných vazeb. Savci, vč. člověka, si tyto kyseliny neumí syntetizovat *de novo* a musí je získávat z potravy. Nazývají se proto jako základní, neboli esenciální (EL-BADRY A KOL. 2007). Tyto kyseliny jsou obsaženy v rostlinných olejích (např. řepkový, slunečnicový či sójový) a v margarínech z těchto olejů vytvořených, některé z těchto kyselin obsahuje také rybí tuk (KUNOVÁ 2004).

Podle umístění dvojně vazby od uhlíku, který je součástí methylové skupiny umístěné na opačném konci řetězce než karboxylová skupina, rozlišujeme nejvýznamnější skupiny PUFA jako n-3 a n-6 (tab. 1, SVAČINA A KOL. 2008).

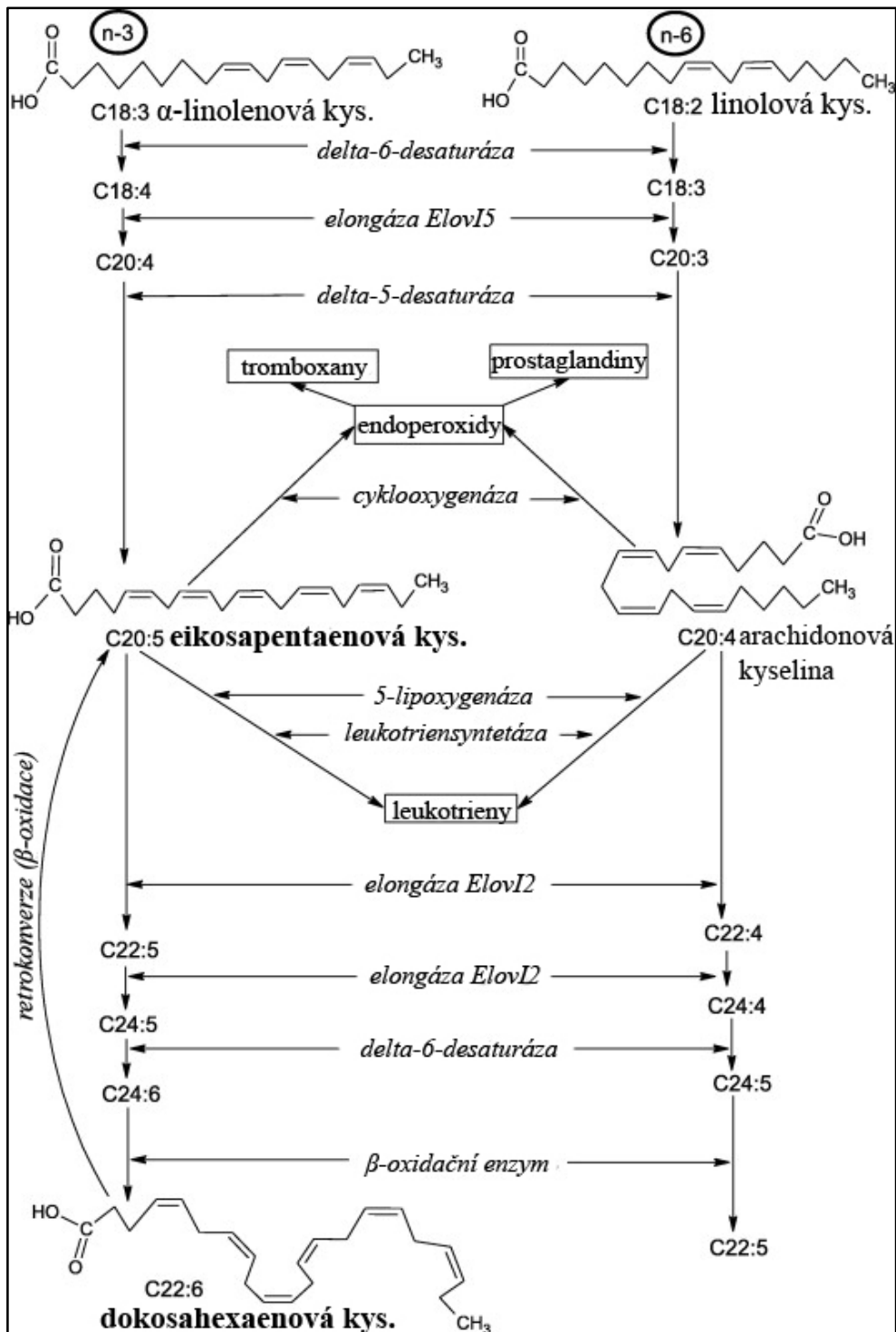
Tab. 1: Nejčastější nenasycené mastné kyseliny (MURRAY A KOL. 2002, upraveno)

	Počet uhlíků:dvojných vazeb	Triviální název	Výskyt
monoénové	16:1 (n-7)	palmitolejová	téměř všechny tuky
	18:1 (n-9)	olejová	nejčastější mastná kys. v přírodních tucích
	22:1 (n-9)	eruková	řepkový a hořčicový olej
dienové	18:2 (n-6)	linolová (LA)	kukuřice, podzemnice olejná, semena bavlníku, sójový olej
trienové	18:3 (n-6)	γ -linolenová (GLA)	někt. rostliny, vejce, pupalkový olej, živočišné tuky
	18:3 (n-3)	α -linolenová (ALA)	často společně s linolovou, hl. lněný olej
tetraénové	20:4 (n-6)	arachidonová (AA)	spolu s linolovou, hl. podzemnice olejná
pentaénové	20:5 (n-3)	eikosapentaénová (EPA)	rybí tuk, vejce
	22:5 (n-3)	dokosapentaénová (DPA)	rybí tuk
hexaénové	22:6 (n-3)	dokosahexaénová (DHA)	rybí tuk

3.2.2.1 Charakteristika polynenasycených mastných kyselin n-6 (PUFA n-6)

Prekurzorem pro syntézu n-6 mastných kyselin, hl. kyseliny arachidonové, je kyselina linolová (LA). Zdrojem této kyseliny mohou být například obiloviny, vejce, živočišný tuk, celozrnné pečivo a slunečnicové nebo kukuřičné oleje (EL-BADRY A KOL. 2007). Syntéza PUFA n-6 z LA probíhá pomocí elongačních a desaturačních reakcí (obr. 1). LA se postupně přeměňuje na kyselinu γ -linolenovou (GLA), dále pak na diho-mo- γ -linolenovou (DGLA) a následně na arachidonovou (AA). Kyselina arachidonová tvoří důležitou součást buněčných membrán živočichů, velké množství nalezneme i v živočišné tukové tkáni (MURRAY A KOL. 2002).

PUFA n-6 mají schopnost aktivovat receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR). Vlivem jejich metabolismu dochází ke zvýšené syntéze cholesterolu (ŽÁK A KOL. 2011), což je pro zdravý organizmus nežádoucí.

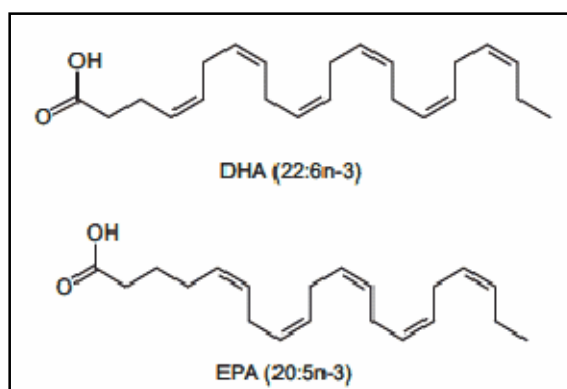


Obr. 1: Syntéza PUFA n-3 a n-6 (KOMPRDA 2012, upraveno)

3.2.2.2 Charakteristika polynenasycených mastných kyselin n-3 (PUFA n-3)

Prekurzorem pro tvorbu n-3 mastných kyselin, převážně eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA), je kyselina α -linolenová (ALA). Bohatým zdrojem kyseliny α -linolenové je listová zelenina, lněná semínka, chia semena, řepkový olej a vlašské ořechy (SIMOPOULOS 2005, DAS 2006).

Obdobný proces syntézy jako u PUFA n-6 probíhá u PUFA n-3 (obr. 1). Z ALA se nejprve tvoří kyselina eikosapentaenová (EPA, obr. 2) a z ní kyselina dokosahexaenová (DHA, obr. 2, HODGSON A KOL. 2005). Z AA, EPA nebo DHA se pak tvoří další produkty – prozánětlivé eikosanoidy, tj. prostaglandiny, leukotrieny, tromboxany a endoperoxidy nebo protizánětlivé lipoxiny (KOMPRDA 2012, FLOCK A KOL. 2013). Eikosanoidy patří do rodiny sloučenin "hormon-like" a obecně modulují funkce ledvin a plic, upravují cévní tonus a hrají roli v zánětlivých reakcích (HODGSON A KOL. 2005).



Obr. 2: Strukturní vzorce DHA a EPA (HYBLEROVÁ 2014)

PUFA n-3 tvoří součást lipidových složek membrán a podstatně ovlivňují jejich vlastnosti, např. permeabilitu, fluiditu a další (STILWELL 1997). U savců a ptáků je ALA důležitou součástí triacylglycerolů a esterů cholesterolu, jen malé množství se nachází ve fosfolipidech. EPA je součástí esterů cholesterolu, triacylglycerolů i fosfolipidů. DHA tvoří součást fosfolipidů, jedná se o nejrozšířenější složku strukturálních lipidů v mozku, velké množství můžeme nalézt v mozkové kůře, sítnici, varlatech a spermích (SIMOPOULOS 2005).

Potrava bohatá na PUFA n-3 příznivě ovlivňuje veškeré aspekty tzv. metabolického syndromu a souvisí s jejich prevencí (KOPECKÝ A KOL. 2009). PUFA n-3 mají blahodárný vliv také u léčby pacientů s revmatoidní artritidou, demencí nebo depresí (KNOPP

1999). Vyšší příjem EPA a DHA snižuje agregaci krevních destiček, riziko zánětu a výrazně zlepšují vlastnosti cévních stěn (BRESLOW 2006).

3.3 Efekt PUFA n-3 a n-6 na zdraví člověka

Obecně platí, že nasycené mastné kyseliny jsou prozánětlivé, nenasyčené mastné kyseliny jsou lehce prozánětlivé nebo neutrální a PUFA n-3 jsou protizánětlivé (CALDER 2006). Celkově mají PUFA n-3 a n-6 významný vliv na zdraví člověka. Esenciální MK, tj. LA a ALA, jsou metabolicky a funkčně odlišné a mnohokrát vedou k opačným fyziologickým funkcím, které jsou důležité pro zdravý vývoj organismu. Náhrada nasycených mastných kyselin za nenasyčené (n-3 i n-6 PUFA) vede ke snížení rizika trombózy a kardiovaskulárních chorob (HODGSON A KOL. 2005).

PUFA n-6 mají opačné působení v organismu oproti n-3. Mezi metabolické produkty z AA, tedy LA, patří eikosanoidy, k nimž řadíme prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny a hydroxymastné kyseliny (SIMOPOULOS 2002, HODGSON A KOL. 2005). Tyto nežádoucí eikosanoidy mohou být biologicky aktivní již v nepatrných množstvích. Pakliže jsou tvořeny ve větším množství, vedou k tvorbě trombů a aterosklerózy, zvyšují riziko alergických a zánětlivých onemocnění a mají vliv na proliferaci buněk (SIMOPOULOS 2002, 2006). Vyšší příjem PUFA n-6 vede k prozánětlivým a protrombotickým stavům, při kterých dochází ke zvýšení viskozity krve, vazospazmu a vazokonstrikci (EL-BADRY A KOL. 2007). Tyto nežádoucí účinky jsou ovšem ovlivněny zvýšenou dávkou PUFA n-6 pouze za předpokladu, že se v těle nenachází dostatečné množství antioxidantů. Pokud se zvýší příjem PUFA n-6 na úkor nasycených mastných kyselin, může dojít k pozitivnímu účinku na metabolismus lipidů, ke snížení krevního tlaku a rizika kardiovaskulárních chorob. Negativní dopad n-6 PUFA také závisí na dalších faktorech, např. na tom o jakou formu se jedná, tj. zda je mastná kyselina z rafinovaného produktu nebo nikoli (HODGSON A KOL. 2005). Obecně je za negativní vlastnost PUFA n-6 považována jejich schopnost zvyšovat syntézu cholesterolu (ŽÁK A KOL. 2011).

Naproti tomu PUFA n-3 pozitivně ovlivňují arytmiie, působí protizánětlivě, také snižují riziko trombózy a ovlivňují imunitní reakce (CALDER 2003). Mimo jiné příznivě ovlivňují patologické stavy, jako jsou zánětlivá artritida, psoriáza, atopická dermatitida, nespecifické záněty střev, autoimunitní onemocnění a bronchiální astma. Vyšší příjem PUFA n-3 snižuje vazodilataci, ovlivňuje agregaci krevních destiček a mění koncentraci

mnoha faktorů zapojených do koagulace a fibrinolýzy (HODGSON A KOL. 2005). Mezi eikosanoidy, tj. metabolické produkty odvozené od ALA, patří tzv. resolviny (řady E z EPA, řady D z DHA), protektiny a maresiny (z DHA, FLOCK A KOL. 2013). Ty patří rovněž do "hormon-like" sloučenin, které ovlivňují prozánětlivé a protrombotické stavy, ale jsou méně biologicky aktivní. Cílem zvýšeného příjmu EPA je změna hodnot nežádoucích eikosanoidů, např. tromboxanu A₂, leukotrienu B₄, ve prospěch žádoucích, např. tromboxanu A₃, leukotrien B₅ (HODGSON A KOL. 2005). Protektiny hrají důležitou roli v protizánětlivých reakcích v nervovém systému, játrech, plicích a očích (MUKHERJEE A KOL. 2004). Resolviny redukují počet neutrofilů, ovlivňují cytokiny a reaktivní formy kyslíku, a tím snižují velikost zánětlivé reakce, maresiny mají obdobnou funkci jako protektiny a resolviny (FLOCK A KOL. 2013). PUFA n-3 plní mimo jiné funkci podobnou antibiotikům a probiotikům (EL-BADRY A KOL. 2007). Podle Perk a kol. (2012) EPA a DHA nemají vliv na hladinu cholesterolu v séru, ale snižují riziko úmrtnosti na ischemickou chorobu srdeční. Dle Kim (2007) zajišťuje DHA optimální neurální a retinální funkce a ovlivňuje životně důležité signální dráhy, zajišťující přežití a diferenciaci neuronů. Obecně platí, že za tyto pozitivní účinky PUFA n-3 je zodpovědné jejich působení v buněčných metabolických dráhách, ovlivnění modulace enzymů a signálních molekul a ovlivnění genové exprese (ZEMAN A KOL. 2006). PUFA n-3 mají protizánětlivé, protitrombotické, vazodilatační a hypolipidemické vlastnosti (EL-BADRY A KOL. 2007). Protizánětlivá vlastnost PUFA n-3 na lidský organizmus je zprostředkována jejich schopností snižovat prozánětlivé mediátory (TNF- α , IL-1, IL-6 a IL-12) a zvyšovat protizánětlivé (IL-10, CALDER 2006, LOSCHER A KOL. 2005).

Existuje spousta rozporuplných studií, kdy se pozitivní či negativní účinky PUFA n-3 a n-6 na organizmus nepotvrdili. Z hlediska prospěchu zdraví není ani tak důležité o jaký typ PUFA se jedná, ale významný je především celkový poměr n-6/n-3, který hraje roli nejen v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění, ale také souvisí se vznikem rakoviny, autoimunitního onemocnění a zánětu (RUSSO 2009). Optimální poměr PUFA n-6/n-3 ve stravě člověka by měl být 1 – 4/1. Za posledních 10 000 let se díky zemědělské revoluci zvýšil příjem obilovin, které obsahují n-6 PUFA. Především v posledních 150 letech má tzv. západní strava za následek zvýšení poměru PUFA n-6/n-3 až na 15 – 20/1 (SIMOPOULOS 2002). Nevyvážený poměr PUFA n-6/n-3 zvyšuje riziko vzniku výše zmíněných onemocnění (KOMPRDA 2012). Rovnováha mezi PUFA n-6 a n-3 je důležitým faktorem pro normální vývoj a homeostázu (SIMOPOULOS 2002).

Novější studie se přiklánějí k myšlence, že klíčovým faktorem je tzv. omega-3 index. Omega-3 index udává procentuální podíl EPA a DHA z celkového množství mastných kyselin v erytrocytech (HARRIS 2008). Tento index se stal objektem mnoha studií, které jej interpretují jako nový biomarker aplikovaný k prevenci a léčbě kardiovaskulárních onemocnění, psychiatrických onemocnění a onemocnění mozku (VON SCHACKY 2011).

Autoři de Backer a kol. (2003) stanovili optimální denní příjem EPA a DHA na 1 g.den⁻¹. Toto množství je dostatečné pro prevenci náhlé srdeční smrti a dalších kardiovaskulárních poruch a při rekonvalescenci po infarktu myokardu. Autoři Musa-Veloso a kol. (2011) prokázali, že již minimální dávka (250 mg.den⁻¹) vede ke snížení rizika náhlého srdečního úmrtí až o 35 %.

Se zvýšenou produkcí tromboxanu A₂, leukotrienu B₄, IL-1 β , IL-6, TNF a C-reaktivním proteinem je spjata mnoho chronických onemocnění, např. kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, rakovina, obezita, autoimunitní onemocnění, revmatoidní artritida, astma nebo deprese. PUFA n-6 působení těchto sloučenin v organismu zesilují, zatímco PUFA n-3 je snižují (SIMOPOULOS 2002).

3.4 Zánět, vznik kardiovaskulárních onemocnění

Zánět hraje klíčovou roli v rozvoji aterosklerózy. Dle studie autorů Libby a kol. (2002) hraje zánět roli ve všech fázích aterosklerózy.

3.4.1 Zánět

Zánět v těle funguje jako okamžitá reakce na infekci nebo zranění. Projevuje se typickými příznaky – zarudnutím, otokem, teplotou a bolestí – které jsou následkem zvýšeného krevního toku a permeability krevních kapilár, což umožňuje prostup velkých molekul (např. protilátek, cytokinů) a leukocytů z krevního řečiště do okolní tkáň. Funkcí zánětu je zprostředkovat počáteční imunitní reakci, eliminovat patogeny a toxiny a opravit poškozenou tkáň. Pohyb buněk (granulocytů, monocytů, makrofágů a lymfocytů) k místu zánětu zprostředkovávají adhezní molekuly, např. ICAM-1, VCAM-1 a selektin E. V místě zánětu dochází k aktivaci buněk např. prostřednictvím bakteriálního endotoxinu. Aktivované makrofágy indukují tvorbu cytokinů (TNF- α), interleukinů (IL-1, IL-6 a IL-8), eikosanoidů (prostaglandin E₂) a dalších zánětlivých mediátorů (CALDER 2006).

3.4.2 Kardiiovaskulární onemocnění

Hlavním rizikovým faktorem vedoucím ke kardiiovaskulárním onemocněním (KVO) dnešní západní populace je rozšíření obezity. Obezita je první příčinou vzniku inzulinové rezistence, hyperglykémie (tj. zvýšená koncentrace glukózy v plazmě), hypertenze a abnormálního krevního lipidového profilu, který postupně přispívá k rozvoji kardiiovaskulárních onemocnění, vedoucích až k mrtvici a infarktu myokardu (ECKEL A KOL. 2005). Kardiiovaskulární onemocnění je obecně způsobené aterosklerotickými degenerativními změnami. Dle WHO jsou kardiiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou úmrtí na světě. V Evropě každý rok na KVO zemře více jak 4,3 miliony lidí (zajímavé je, že častěji na KVO umírají ženy (55 %), zatímco muži méně často (43 %)). Tyto údaje potvrzují i statistiky příčin úmrtí v ČR, kde mají na svědomí až 58 % úmrtí.

3.4.3 Arterioskleróza

Arterioskleróza patří do skupiny zánětlivých onemocnění, které vedou ke změnám funkce a struktury cév (SIMOPOULOS 2005). Tyto změny jsou charakterizované ztenčením a ztrátou elasticity cévních stěn.

Existují 3 hlavní typy arteriosklerózy (NEWMAN DORLAND 2011):

- arterioloskleróza
- Mönckebergova arterioskleróza
- ateroskleróza (nejčastější typ)

3.4.3.1 Arteriolskleróza

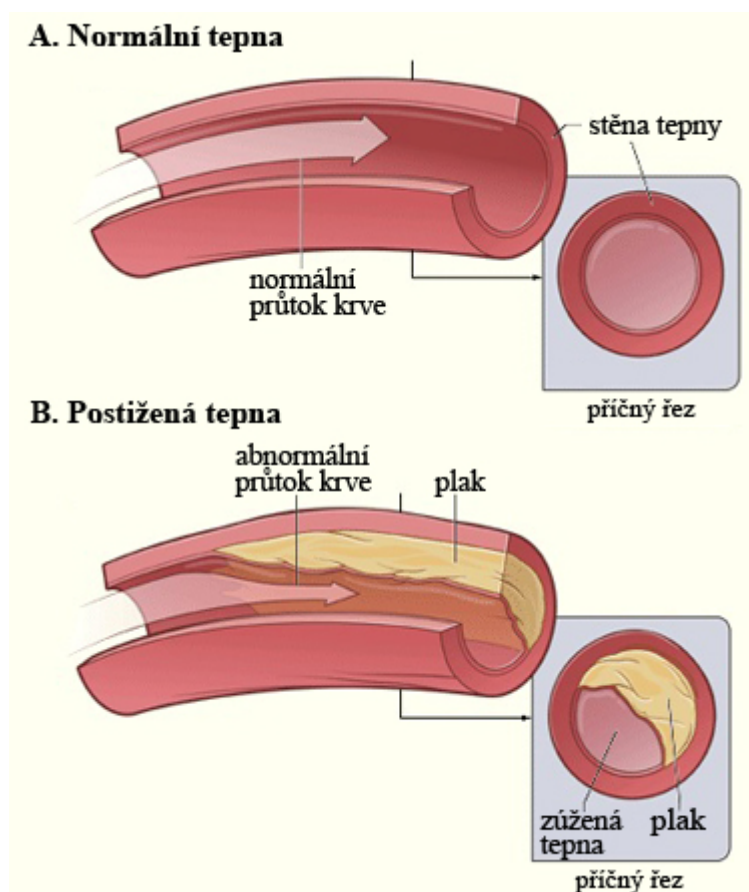
Arteriolskleróza je charakteristická tvorbou aterosklerotického plátu ve stěnách arteriol. Důsledkem je zúžení těchto malých tepen, které vede k nedostatečnému přívodu krve do orgánů (nejčastěji bývají postižené ledviny, NEWMAN DORLAND 2011).

3.4.3.2 Mönckebergova arterioskleróza

Mönckebergova arterioskleróza, též známá jako mediokalcinóza, postihuje střední a malé cévy. Spočívá v tom, že se vápník usazuje ve stěnách cév. Tyto vápenaté usazeniny pak způsobují zpevnění stěn arteriol, zatímco nedochází k jejich zúžení. Jedná se o relativně neškodnou formu onemocnění (NEWMAN DORLAND 2011).

3.4.3.3 Ateroskleróza

Ateroskleróza způsobuje patofyziologické změny velkých tepen, které vedou okysličenou krev k orgánům. Dochází k tvorbě plaků neboli usazenin, které se skládají z tuku (zejména cholesterolu), buněčných odpadů, komplexů sacharidů a vápníku, odumřelých buněk a krevních produktů (hl. fibrinu). Postupem času tento plak ztvrdne a má za následek zúžení tepny, čímž ji částečně nebo úplně zablokuje a zamezí tak průtoku krve. Plaky jsou schopné se oddělit a putovat spolu krví do vzdálených orgánů, kde mohou způsobit závažné problémy – plicní embolie, infarkty, gangrény, mrtvice a v nejhorších případech i smrt (AMERICAN HEART ASSOCIATION 2014, BERÁNKOVÁ A KOL. 2012, SIMOPOULOS 2005).



Obr. 3: Rozdíl mezi normální a tepnou postiženou aterosklerózou (NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE 2014, upraveno)

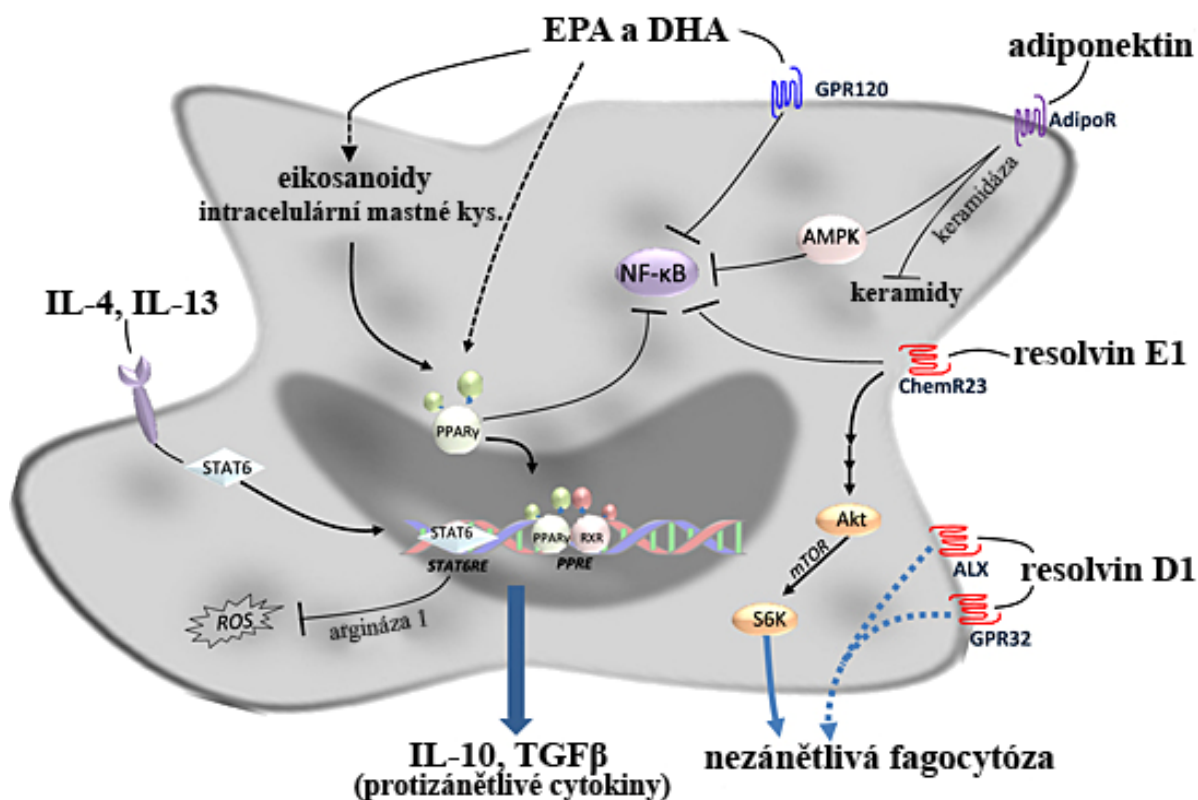
3.5 Vliv PUFA n-3 a n-6 na expresi genů

Metabolismus lipidů a lipoproteinů je regulován řadou genů. Modulací exprese těchto genů se organismus adaptuje na aktuální změny energie (AFMAN A MÜLLER 2012). Sa-

motná exprese těchto genů je řízena nukleárními receptory, tj. transkripčními faktory. Prostřednictvím specifických či nespecifických interakcí s ligandy (např. PUFA) se aktivují transkripční faktory (TF), ty se váží na *cis*-regulační oblasti cílových genů, a tak umožňují jejich transkripci (KAPUT A RODRIGUEZ 2004, KLUSÁČKOVÁ A SKOUMALOVÁ 2012). Mnoho studií došlo k závěru, že funkci primárních transkripčních faktorů zastávají receptory aktivované proliferátory peroxizomů tzv. PPAR. V dnešní době je známa i řada dalších transkripčních faktorů např. HNF-4 α (jaterní jaderný faktor 4 α), NF- κ B (jaderný faktor κ B), RXR α (retinoidní X receptor α), LXR α a LXR β (jaterní X receptory α a β) a SREBP-1c (sterol regulační vazebný protein 1c, AFMAN A MÜLLER 2012, KLUSÁČKOVÁ A SKOUMALOVÁ 2012). Mezi funkce PUFA n-3 patří jejich schopnost snižovat aktivitu prozánětlivého transkripčního faktoru NF- κ B a schopnost zvyšovat aktivitu protizánětlivého transkripčního faktoru PPAR γ prostřednictvím receptoru spřaženého s G-proteinem, tzv. GPR120 (CALDER 2012).

3.5.1 Genová exprese

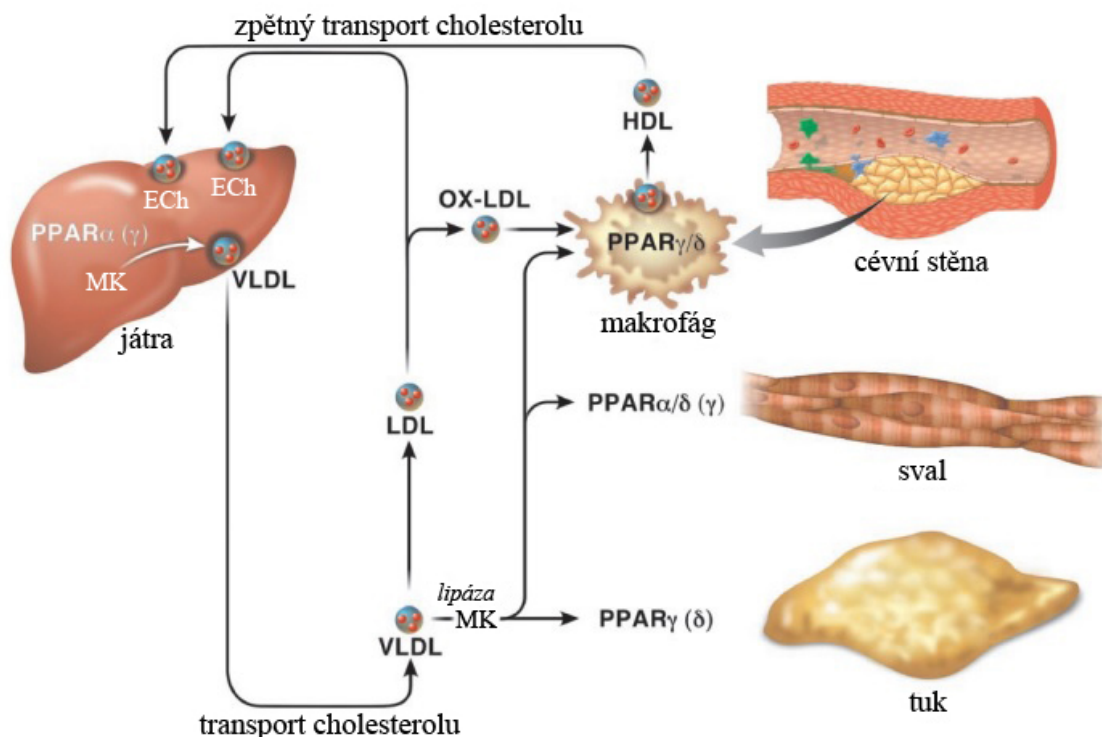
Genová exprese je proces, v průběhu kterého je genetická informace uložená v DNA převedena do struktury proteinu. Molekuly DNA obsahují informaci k ovládání aktivit buněk a k řízení vývoje, fungování a chování organismů, které tyto buňky obsahují. Tato informace je zakódována v sekvencích nukleotidů uvnitř molekul DNA, tvořících genom. Strukturou a funkcí celých genomů se zabývá genomika (SNUSTAD A SIMMONS 2009). Relativně novým podoborem genetiky je nutrigenomika. Nutrigenomika využívá technologie genomiky k tomu, aby odhalila, jak složky potravy mohou ovlivňovat genovou expresi a celkový metabolismus organismu (AFMAN A MÜLLER 2012).



Obr. 4: Diferenciace makrofágů M2 podporovaná EPA a DHA (FLOCK A KOL. 2013, upraveno); EPA = kys. eikosapentaenová, DHA = kys. dokosahexaenová, GPR120 = receptor spřažený s G-proteinem, PPAR γ = receptor aktivovaný proliferátory peroxizomu γ , IL-4, IL-13 a IL-10 = interleukiny, TGF β = transformující růstový faktor β , STAT6 = přenašeč signálu a aktivátor transkripce, NF- κ B = jaderný faktor κ B, AMPK = AMP-aktivovaná proteinkináza, ChemR23 = receptor pro resolvin E1, ALX = lipoxin A4 receptor pro resolvin D1, GPR32 = receptor pro resolvin D1, Akt = proteinkináza B, S6K = ribozomální proteinkináza

3.5.2 Rodina PPAR, funkce PPAR γ

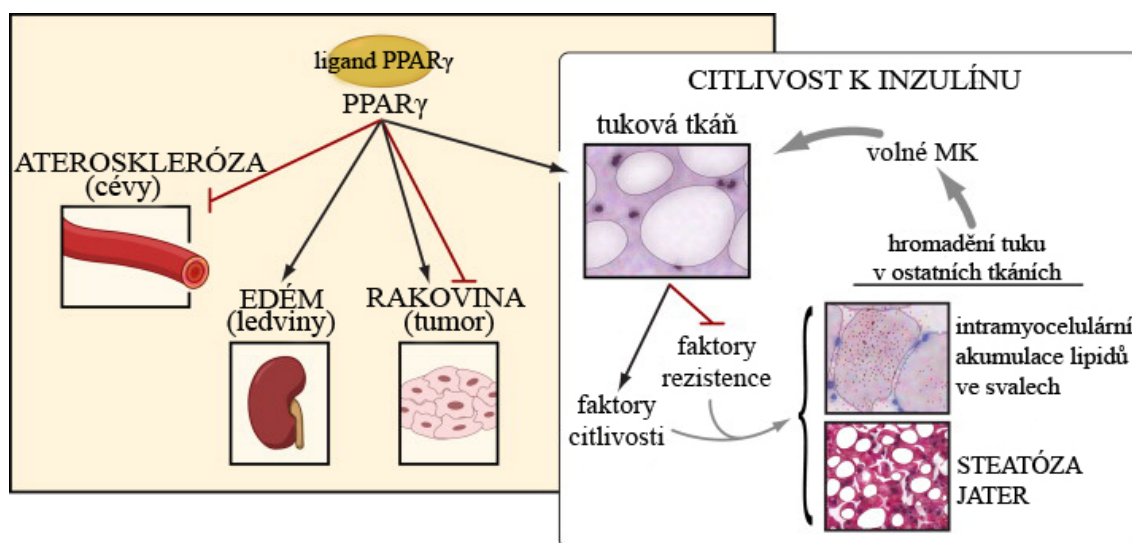
Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR), objevené v roce 1990 (LATRUFFE A VAMECQ 1997), jsou transkripční faktory, které patří do velké skupiny steroidních receptorů (DAS 2006). Jedná se o jaderné receptory mastných kyselin, které hrají důležitou roli u metabolických chorob spojených s obezitou, tj. hyperlipidemie, inzulínové rezistence nebo ischemické choroby srdeční (LEE A KOL. 2003). Jedná se o rodinu transkripčních faktorů aktivovaných řadou syntetických nebo přírodních ligandů, mezi které patří i PUFA (DRAPER A KOL. 2011). Tato rodina zahrnuje tři izotypy: PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ (Obr. 5, LEE A KOL. 2003).



Obr. 5: Působení rodiny PPAR v tkáních (LEE A KOL. 2003, upraveno); MK = mastné kyseliny, PPAR = receptory aktivované proliferátory peroxizomu, ECh = estery cholesterolu, VLDL = lipoprotein s velmi nízkou hustotou, LDL = lipoprotein s nízkou hustotou, OX-LDL = oxidovaný lipoprotein s nízkou hustotou, HDL = lipoprotein s vysokou hustotou

Každý z izotypů má odlišné vlastnosti a reguluje jiné biologické procesy (MANDARD A KOL. 2004) na základě potřeb specifické tkáně (LEE A KOL. 2003). Nejlépe prozkoumaný je izotyp PPAR α (MANDARD A KOL. 2004). Gen *PPAR α* je exprimován v játrech, srdci, svalech a ledvinách, kde zesiluje katabolismus mastných kyselin. *PPAR β/δ* je všudypřítomný a jeho funkce není zcela objasněná. Mimo jiné se účastní diferenciaci keratinocytů, hojení ran a signalizace v makrofázích (LEE A KOL. 2003). *PPAR γ* je vysoce zastoupený v adipocytech a makrofázích, hraje významnou roli během diferenciaci adipocytů z fibroblastů, při ukládání lipidů v tukových buňkách a v homeostáze glukózy. Aktivace *PPAR γ* vyrovnává hladinu lipidů a může tak přispět ke zlepšení aterosklerotického zánětu, naopak makrofágy, postrádající *PPAR γ* , jsou defektní ve vylučování lipidů a mohou způsobit progresi zánětu (LEE A KOL. 2003). *PPAR γ* je preferovaným receptorem pro navázání ligandů PUFA (FLOCK A KOL. 2013).

Gen pro receptory aktivované proliferátory peroxizomů γ ($PPAR\gamma$) se u potkanů nachází na chromozomu 4, u lidí na chromozomu 3 (DATABÁZE GENBANK). $PPAR\gamma$ je jedním z transkripčních faktorů, který zvyšuje diferenciaci adipocytů, ovlivňuje také metabolismus glukózy a lipidů, moduluje obezitu, citlivost na inzulín a dyslipidemii (SU A KOL. 2014, ANGHEL A WAHLI 2007). Aktivita $PPAR\gamma$ působí odlišně v různých tkáních (obr. 6), má efekt nejen na diferenciaci adipocytů a rezistenci na inzulín, ale také na vznik kardiovaskulárních onemocnění a zánětů, funkci ledvin a tvorbu nádorů (Obr. 6, LEHRKE A LAZAR 2005).



Obr. 6: Rozdílný efekt $PPAR\gamma$ v organismu (LEHRKE A LAZAR 2005, upraveno)

$PPAR\gamma$ může aktivovat transkripci nebo může být promotor-specifickým represorem genů zánětlivé odpovědi (FLOCK A KOL. 2013). $PPAR\gamma$ řídí přirozenou i adaptivní imunitní reakci prostřednictvím negativní regulace makrofágů a monocytů (VON KNETHEN A BRÜNE 2002). $PPAR\gamma$ hraje klíčovou roli při zrání alternativně aktivovaných makrofágů, které mají protizánětlivé vlastnosti (ODEGAARD A KOL. 2007). Makrofágy se diferencují z monocytů vlivem cytokinů dvojitou cestou. Za prvé klasicky aktivované, kdy vlivem interleukinů IL-12 a IL-23 vznikají prozánětlivé formy makrofágů (tzv. M1 makrofágy), dochází ke kumulaci lipidů a vzniku pěnové buňky. Dále se rozvíjí nekrotické jádro aterosklerotického plátu a vytváří se vazivová čepička aterosklerotické léze. Za druhé alternativně aktivované, kdy vlivem interleukinu IL-10 vzniká protizánětlivý fenotyp makrofágů – tzv. M2 makrofágy (RIŠKO A KOL. 2012). EPA a DHA prostřednictvím aktivace $PPAR\gamma$ podporuje přepínání mezi těmito dvěma fenotypy makrofágů. Po zánětlivém stimulu se do buněčné membrány začleňují protizánětlivě

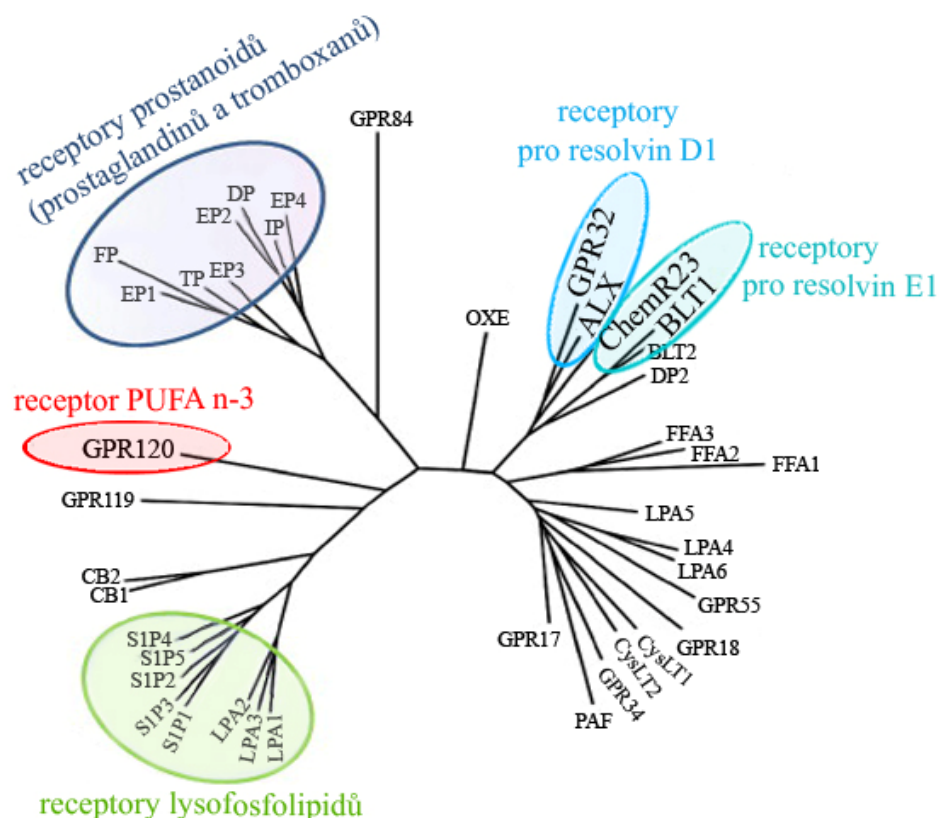
vé eikosanoidy, některé z nich slouží jako ligandy *PPAR* γ , přímo ovlivňují genovou expresi a inhibují *NF- κ B*, který indukuje transkripci. IL-4 a IL-13 stimulují makrofágy, což vede k fosforylaci transkripčních faktorů STAT6, které interagují s *PPAR* γ , a tím vyvolávají tvorbu M2 fenotypu (Obr. 4, FLOCK A KOL. 2013).

PPAR γ blokuje jaderný faktor κ B, který má prozánětlivou schopnost. Nebylo však potvrzeno, že imunomodulační vlastnosti *NF- κ B* zprostředkované PUFA n-3 souvisí s *PPAR* γ . PUFA n-3 snižují aktivitu *NF- κ B*, což ovlivňuje zrání dendritických buněk nezávisle na *PPAR* γ (DRAPER A KOL. 2011).

3.5.3 Gen pro receptor spřažený s G-proteinem (*GPR120*), jeho funkce

Receptor spřažený s G-proteinem, kódovaný genem *GPR120*, nacházejícím se u potkanů na chromozomu 1, u lidí na chromozomu 10 (DATABÁZE GENBANK), patří do rodiny receptorů, která je charakterizována společnými strukturními prvky a schopností aktivovat heterotrimerní G-proteiny (obr. 7, IM 2012).

Jedná se o skupinu důležitých signálních molekul, které ovlivňují řadu buněčných funkcí tím, že stimulují a indukují buněčné odpovědi prostřednictvím druhých posílů (YOUNG OH A KOL. 2010). K aktivaci *GPR120* dochází pomocí ligandů, kterými jsou dlouhé řetězce mastných kyselin (HIRASAWA A KOL. 2005). *GPR120* funguje jako receptor pro EPA a DHA na buněčném povrchu makrofágů nebo adipocytů, potlačuje zánět, indukovaný makrofágy, a vyvolává citlivost na inzulín. Studie autorů Young Oh a kol. (2010) prokázala, že *GPR120* je hojně exprimován v tukové tkáni, v prozánětlivých makrofázích M1 a zralých adipocytech. Po navázání ligandu PUFA n-3 na *GPR120* dochází k potlačení zánětlivých signalizačních drah TLR (tzn. "toll-like" receptory imunitního systému, které jsou schopny rozeznávat cizorodé struktury organismu) a TNF- α , což má silné protizánětlivé účinky.



Obr. 7: Fylogenetický strom rodiny GPR (IM 2012, upraveno)

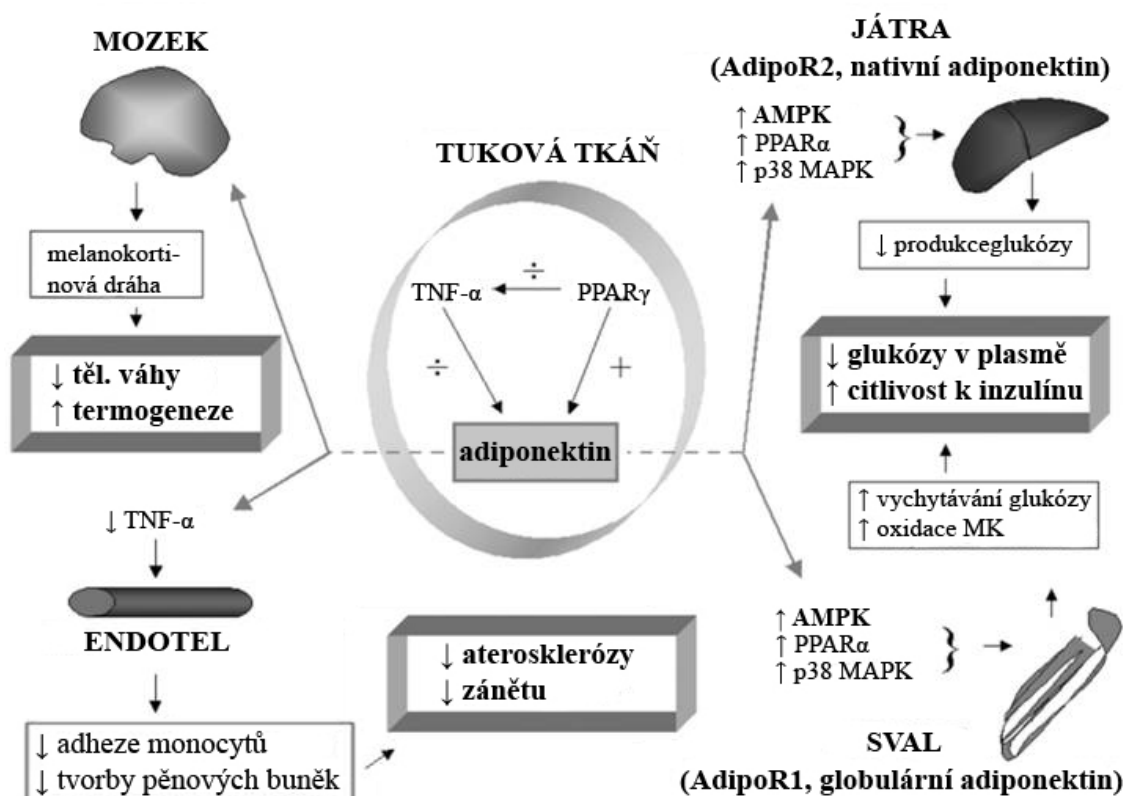
V zánětlivém procesu hrají roli i další receptory rodiny GPR. Resolvin E1 (z EPA), který se váže na receptor ChemR23, reguluje fosforylaci signální proteinkinázy Akt a ribozomální proteinkinázy S6K, tím dochází k pohlcení apoptických buněk a zahájení nezápětlivé fagocytózy. Obdobnou protizánětlivou funkci zastává i resolvin D1 (z DHA), který se váže na receptory ALX a GPR32 (Obr. 4, FLOCK A KOL. 2013).

3.5.4 Adiponektin a jeho receptory AdipoR1 a AdipoR2

Adiponektin, který byl poprvé charakterizovaný autory Scherer a kol. (1995), je specifický protein, produkovaný adipocyty v tukové tkáni (MAEDA A KOL. 1996). Jedná se o hormon, kódovaný genem *AdipoQ*, nacházejícím se na chromozomu 11 u potkanů (DATABÁZE GENBANK), který moduluje metabolismus glukózy a mastných kyselin (DIEZ A IGLESIAS 2003). Adiponektin hraje roli v rozvoji inzulínové rezistence a aterosklerózy. Nižší exprese *AdipoQ* je spojena s projevem rezistence na inzulín, zatímco vyšší exprese *AdipoQ* vede k snížení rozvoje diabetu typu II, snížení hladiny glukózy v plazmě a zvýšení citlivosti na inzulín. K vyšší citlivosti dochází prostřednictvím

zvýšené oxidace mastných kyselin a inhibice tvorby glukózy v játrech. Hladina adiponektinu může být zvýšena pomocí antidiabetik (tzn. thiazolidindionů) a redukována prozánětlivými cytokiny, hl. TNF- α (LIHN A KOL. 2005). Obecně má adiponektin protizánětlivé (OUCHI A KOL. 2003), antiaterogenní (YAMAUCHI A KOL. 2003), antiangiogenní a protinádorové vlastnosti (BRAKENHIEL A KOL. 2004). Adiponektin snižuje rozvoj aterosklerózy tím, že zabraňuje přeměně makrofágů na pěnové buňky (POLÁK A KOL. 2006).

Existují dva receptory pro adiponektin, jeden kódovaný genem *AdipoR1* (u potkanů na chromozomu 13, u lidí na chromozomu 1, DATABÁZE GENBANK) a druhý genem *AdipoR2* (u potkanů na chromozomu 4, u lidí na chromozomu 12, DATABÁZE GENBANK). Tyto receptory jsou strukturně podobné receptorům spřaženým s G-proteinem, ale funkčně odlišné. Adiponektin vylučovaný z adipocytů se váže na receptor AdipoR na buněčném povrchu, redukuje obsah keramidů a inhibuje *NF- κ B* prostřednictvím AMP-aktivované proteinkinázy (Obr. 4, FLOCK A KOL. 2013). Navázáním adiponektinu na receptory dochází k aktivaci AMPK (YAMAUCHI A KOL. 2003), což stimuluje β -oxidaci mastných kyselin v játrech a kosterním svalstvu, inhibuje syntézu cholesterolu a triacylglycerolů, inhibuje lipolýzu a lipogenezi adipocytů, reguluje vychytávání glukózy ve svalech a moduluje sekreci inzulínu pankreatickými β -buňkami (WINDER A HARDIE 1999). *AdipoR1* je hojně exprimován v kosterním svalstvu, zatímco *AdipoR2* je exprimován převážně v játrech (obr. 8, YAMAUCHI A KOL. 2003). Oba receptory jsou také hojně exprimovány v bazálních β -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní (KHARROUBI A KOL. 2003), v makrofázích, u aterosklerotických lézí (CHINETTI A KOL. 2004) a v mozku (YAMAUCHI A KOL. 2003).



Obr. 8: Vliv adiponektinu na různé tkáně (LIHN A KOL. 2005, upraveno); PPAR = receptory aktivovaný proliferátor peroxizomu gamma, TNF- α = tumor nekrotizující faktor alfa, AMPK = AMP-aktivovaná proteinkinázy, MAPK = proteinkináza aktivovaná mitogeny

Ve studii autorů Itoh a kol. (2007) bylo prokázáno, že kyselina eikosapentaenová zvyšuje koncentraci adiponektinu v séru, aniž ovlivní jeho expresi a tlumí zánětlivé změny tukové tkáně. Obdobně zvyšuje koncentraci adiponektinu i kyselina dokosahexaenová (BHASWANT A KOL. 2015). Studie autorů Gonzáles-Pérez a kol. (2009) prokázala, že DHA eliminuje riziko steatózy jater spjaté s jaterní lipogenezí, β -oxidací mastných kyselin a regulací koncentrace sérového cholesterolu.

3.5.5 Gen pro jaderný faktor κ B (*NF- κ B*)

Nukleární jaderný faktor κ B je proteinový komplex, který stimuluje expresi genů zapojených do velkého množství biologických funkcí (např. imunitní a zánětlivé reakce, buněčný růst). Gen *NF- κ B* se u potkanů nachází na chromozomu 2, u lidí na chromozomu 4 (DATABÁZE GENBANK). *NF- κ B* může být aktivovaný řadou molekul, vč. cytokinů, volných kyslíkových radikálů, virových a bakteriálních produktů či ultrafialovým

zářením. Nesprávná aktivace jaderného faktoru je spojena se zánětlivými stavy, které vedou k rozvoji různých onemocnění, jako je autoimunitní artritida, astma, septický šok, plicní fibróza, glomerulonefritida, ateroskleróza nebo AIDS (CHEN A KOL. 1999). V poslední době bylo prokázáno, že *NF- κ B* je antagonistou *PPAR γ* (DRAPER A KOL. 2011).

3.5.6 Gen pro β -aktin (*ACTB*)

Beta aktin patří do rodiny vysoce konzervovaných proteinů. Existuje šest typů aktinů – čtyři z nich jsou přítomny pouze ve svalových buňkách, kde se podílejí na napínání svalových vláken, β -aktin a γ -aktin se nachází ve všech buňkách organismu, kde se účastní základních buněčných procesů (GENETICS HOME REFERENCE 2015). Gen pro β -aktin se u potkanů nachází na chromozomu 12, u lidí na chromozomu 8 (DATABÁZE GENBANK). *ACTB* se běžně používá jako referenční gen pro řadu metod, vč. qPCR (STEPHENS A KOL. 2011).

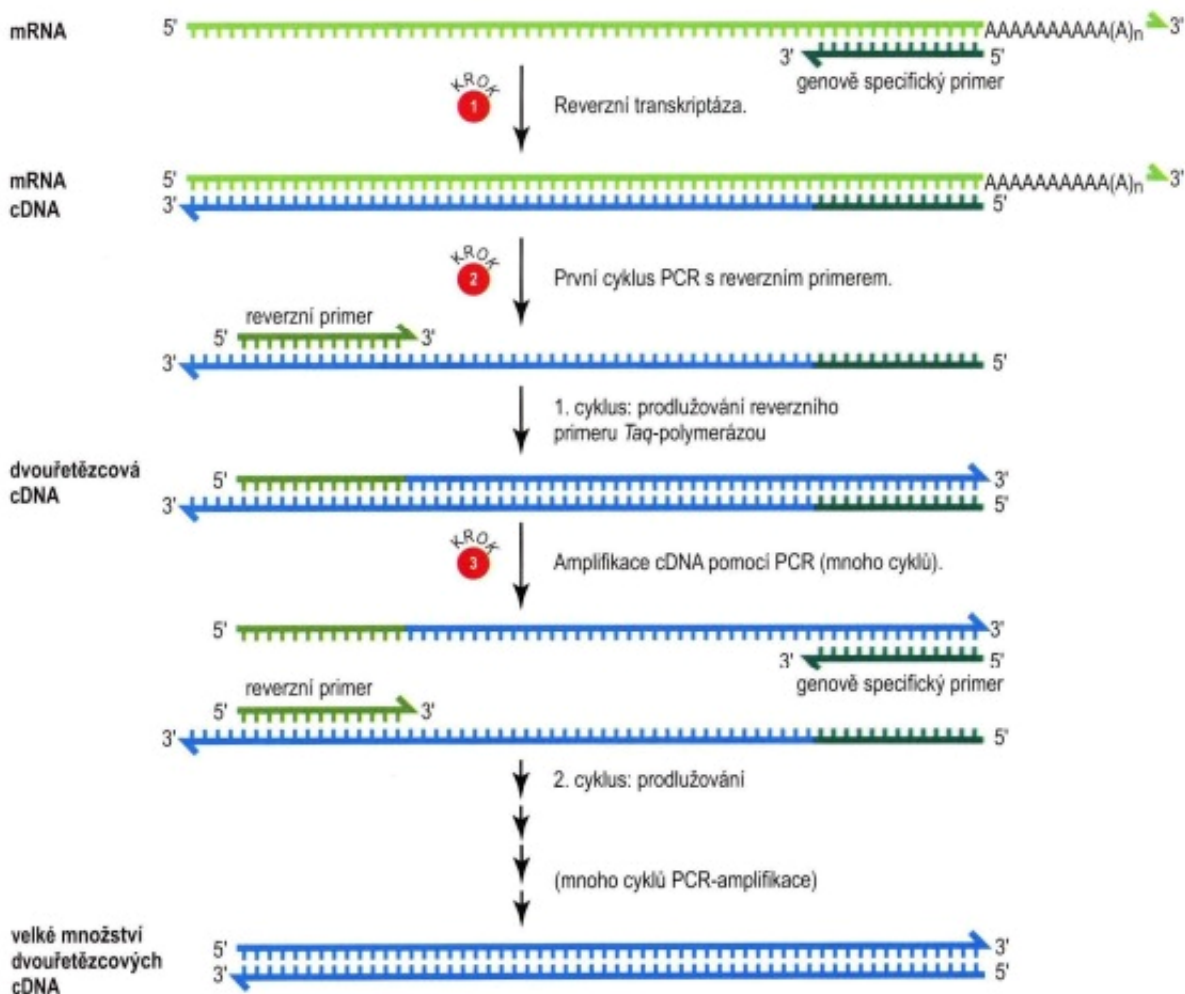
3.6 Analýza genové exprese pomocí metod molekulární biologie

Expresi genů rozdělujeme do dvou hlavních fází: transkripce a translace, proto metody analýzy genové exprese rozlišujeme na metody studia mRNA, tj. studium transkripce, a proteinů, tj. studium translace. Mezi metody studia transkripce patří např. Northernový přenos, reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce nebo hybridizace *in situ* (ŠMARD A KOL. 2005). V současnosti dochází k neustálému vývoji nových metod, které se využívají ke studiu genové exprese. Jedna z nejpoužívanějších technik molekulární biologie je dodnes polymerázová řetězová reakce (PCR = polymerase chain reaction).

Metodu polymerázové řetězové reakce zavedl v roce 1985 Kary B. Mullis (a roku 1993 za ni získal Nobelovu cenu). Principem PCR je syntéza nových řetězců nukleových kyselin prostřednictvím DNA-polymerázy ve směru 5' \rightarrow 3'. Optimální počet cyklů je 25 – 35, během kterých se exponenciálně zvyšuje počet kopií templátu. Jeden cyklus zahrnuje 3 kroky: denaturaci dvouřetězových molekul, připojení primerů a syntézu nových řetězců. Reakce probíhají ve speciálních zařízeních zvaných termocykly. Výsledný produkt je po ukončení reakce detekován elektroforeticky (ŠMARD A KOL. 2005). V této práci se zaměřím na podrobnější charakteristiku dvou modifikací PCR.

3.6.1 Charakteristika reverzně-transkripční PCR (RT-PCR)

Reverzně-transkripční PCR je určena pro amplifikaci molekul RNA. Jelikož RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR, je potřeba převést izolovanou mRNA do cDNA pomocí zpětné (reverzní) transkriptázy (ŠMARDA A KOL. 2005). Enzym reverzní transkriptáza katalyzuje syntézu řetězců DNA, komplementárních k templátu mRNA. Výsledné jednořetězcové molekuly DNA se mohou převést na dsDNA pomocí různých metod, např. metoda s použitím druhého primeru a tepelně stabilní *Taq* DNA-polymerázy. Výsledné molekuly DNA se následně amplifikují prostřednictvím standardní PCR (Obr. 9, SNUSTAD A SIMMONS 2009). Hlavní výhodou této metody je možnost detekce specifické mRNA v jediné buňce, kdy se mRNA vyskytuje ve velmi malém množství, a možnost detekce mRNA z těžko získatelných buněk (ŠMARDA A KOL. 2005).



Obr. 9: Amplifikace mRNA prostřednictvím RT-PCR (SNUSTAD A SIMMONS 2009)

3.6.2 Charakteristika metody kvantitativní PCR (qPCR, real-time RT-PCR)

Kvantitativní PCR je metoda molekulární biologie, která je založena na principu klasické PCR. Při klasické PCR je obvykle amplifikovaný produkt detekován pomocí gelové elektroforézy až po ukončení PCR reakce. Při metodě real-time PCR je produkt detekován a měřen po každém proběhnutém cyklu, což umožňuje detekci produktu a zároveň kvantifikaci předvoleného množství templátu. K tomuto účelu slouží buď fluorescenční barvivo, které po navázání na dsDNA fluoreskuje, jeho nevýhodou však může být tvorba nespecifit, nebo reakce probíhá s použitím specifických sond (ŠMARD A KOL. 2005).

V současné době existují čtyři různé fluorescenční DNA sondy nejčastěji používané pro detekci PCR produktů: SYBR Green, TaqMan, molekulární majáky a tzv. škorpióny. TaqMan sondy jsou oligonukleotidy s fluorescenční značkou na 5' konci a zhášecem na 3' konci, které se váží na vnitřní část amplifikované sekvence. Během PCR reakce je sonda rozštěpena pomocí 5' exonukleázové aktivity DNA-polymerázy a dochází k fluorescenci. Molekulární majáky mají obdobnou strukturu jako TaqMan sondy, obsahují fluorescenční značku na 5' konci a zhášec na 3' konci, v intaktním stavu tvoří vlásenky, po navázání na cílovou sekvenci DNA dojde k fluorescenci. Škorpióny kombinují vlastnosti TaqMan sond a molekulárních majáků, jejich molekuly na sebe váží primer, po proběhnutí PCR dojde k intramolekulárnímu přeskupení, kdy se separuje fluorofor a zhášec a vzniká fluorescence (LIFE TECHNOLOGIES 2015).

Za nejjednodušší a nejekonomičtější metodu pro detekci PCR produktu se v dnešní době považuje použití interkalačních barviv. SYBR Green patří mezi kyaninová barviva, která se váží do malého žlábků dsDNA a po excitaci fluoreskují. Se zvyšujícím množstvím PCR produktu se zvyšuje i fluorescenční signál. Nevýhodou této metody je, že se mohou tvořit nespecifity, což nadhodnocuje výsledné signály (LIFE TECHNOLOGIES 2015).

Množství PCR produktu je přímo úměrné měřené fluorescenci. Reakce probíhá ve speciálním cyklu, který po každém cyklu zaznamenává naměřenou fluorescenci. Tyto údaje jsou poté zpracovány softwarem, který sestrojí graf křivky amplifikační reakce, kde na ose x leží počty jednotlivých cyklů a na ose y je zaznačená naměřená fluorescence. Křivka amplifikační reakce má dvě fáze – exponenciální a neexponenciální. V exponenciální fázi se v každém cyklu množství PCR produktu zdvojnásobí. V neexponenciální fázi, tzv. plató, dojde k vyčerpání některého z komponentů reakce, a proto se množství PCR produktu dále nezvyšuje (BUSTIN 2000).

Na počátku reakce je fluorescence nízká a nelze ji detekovat. V průběhu reakce se postupně zvyšuje množství PCR produktu, čímž se zvyšuje i měřená fluorescence. Právě ten cyklus, ve kterém se nahromadilo dostatečné množství PCR produktu a lze detekovat fluorescenci, se nazývá cycle of threshold (C_T). Hodnoty C_T jsou pro jednotlivé vzorky různé a závisí na počátečním množství templátu. Čím vyšší je množství templátu, tím méně cyklů stačí k dosažení detekovatelné fluorescence a tím nižší hodnotu C_T má daný vzorek. C_T hodnota zaznamenává, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje (BUSTIN 2000).

Existují dva typy kvantifikace DNA: absolutní (množství DNA odečítáme z kalibrační křivky) nebo relativní. Pro stanovení míry genové exprese se ideálně používá relativní kvantifikace, která nevyžaduje stanovení kalibrační křivky. Množství fluorescence daného genu se pak porovnává s množstvím fluorescence referenčního, tzv. housekeepingového genu (ŠMEHILOVÁ 2011). Referenční geny, též známé jako provozní geny, zajišťují životně důležité biochemické procesy každé buňky a jsou exprimovány ve všech buňkách organismu.

Mezi hlavní pozitiva této metody patří její vysoká citlivost, specifická a přesnost kvantifikace. Metoda proto slouží k přesnému stanovení změn exprese daného genu (DUDOVÁ A HÁJEK 2008).

3.6.3 Metody hodnocení relativní kvantifikace

Jednou ze základních metod využívajících stabilní exprese referenčních genů je metoda $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Tato metoda je závislá na tom, že reakce probíhá se 100% účinností, tzn. že se v každém cyklu množství kopií zdvojnásobí. Normalizace k referenčnímu genu slouží pro interní kontrolu chyb v real-time PCR. Hodnota exprese referenčních genů by měla být podobná u všech vzorků ve studii, měla by být odolná vůči podmínkám experimentu a procházet všemi kroky amplifikace se stejnou kinetikou jako cílový gen (LIVAK A SCHMITTGEN 2001).

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(C_{T \text{ cíl.gen}} - C_{T \text{ ref.gen}})_{\text{vzorek}} - (C_{T \text{ cíl.gen}} - C_{T \text{ ref.gen}})_{\text{kalibrátor}}}$$

Vzhledem k tomu, že mnoho PCR reakcí nevykazuje ideální efektivitu (přítomnost inhibitorů, variabilita nukleotidů atd.), je vhodné stanovit efektivitu reakce a její hodnotu zahrnout do výpočtu (PFAFFL 2001).

$$\text{Expresní poměr} = \frac{(E_{\text{cíl.gen}})^{\Delta C_T (\text{kalibrátor-vzorek})}}{(E_{\text{ref.gen}})^{\Delta C_T (\text{kalibrátor-vzorek})}}$$

Vysvětlivky:

$E_{\text{cíl.gen}}$ efektivita reakce (stanovená dle standart.křivek) pro cíl. gen

$E_{\text{ref.gen}}$ efektivita reakce (stanovená dle standart.křivek) pro ref. gen

ΔC_T rozdíl C_T hodnot mezi kalibrátorem a vzorkem

3.7 Extrakce lipidů

Extrakce je metoda dělení látek podle rozpustnosti. Při extrakci jsou v kontaktu dvě navzájem nemísitelné fáze, mezi které se rozdělují látky podle jejich rozdělovacích koeficientů. V případě lipidů je potřeba použít směs mísitelných rozpouštědel – nepolární (nejčastěji uhlovodík), který naruší hydrofobní a van der Waalsovy interakce, a polární (alkohol) – přeruší vodíkové a iontové vazby (COUFAL 1996, HAJŠLOVÁ 2009).

3.8 Plynová chromatografie mastných kyselin

Plynová chromatografie je metoda určená k oddělování a stanovení plynů, kapalin i pevných látek. Stacionární fází může být pevná látka nebo kapalina a mobilní fází je plyn. Metoda je jednoduchá, rychlá, účinná a vyžaduje malé množství vzorku. Před samotnou plynovou chromatografií, je potřeba převést mastné kyseliny na jejich nízkomolekulární nepolární deriváty (např. ethyl estery, CHRISTIE 1989).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Charakteristika krmného pokusu (laboratorní zvířata, podmínky chovu, krmná směs)

Krmný pokus byl proveden ve speciálních prostorách Ústavu výživy zvířat a pícninářství AF Mendelovy univerzity v Brně, přizpůsobených pro chov laboratorních zvířat, v souladu se zákonem České národní rady č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a byl schválen Komisí na ochranu zvířat proti týrání Mendelovy univerzity v Brně.

Jako modelový organizmus pro tento experiment byl zvolen laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*). Byli použiti dospělí samci (stáří 10 týdnů, průměrná živá hmotnost byla $293,9 \pm 30,0$ g) laboratorního potkana outbredního kmene *Wistar albino* ze SPF chovu společnosti Bio Test, Konárovice, s.r.o., Česká republika. Potkani byli označeni a umístěni do plastových boxů ($53,5 \times 32,5 \times 30,5$ cm) po pěti kusech. V místnosti byla udržována stabilní teplota 23 ± 1 °C, vlhkost 60% a světelný režim 12 h světlo/12 h tma (maximální intenzita 200 lx). Každý den ve stejnou hodinu bylo krmivo odebíráno a váženo a potkanům bylo podáno nové krmivo. Potkani měli nepřetržitý přístup k pitné vodě a každý týden se potkani vážili. Celkově krmný pokus probíhal 14 týdnů.

Prvních 7 týdnů byla potkanům jednotně podávána základní krmná směs, obsahující kompletní krmnou směs pro myši a potkany (MYPO, Biokron, Blučina, Česká republika) s přídatkem hovězího loje, slazeného kondenzovaného mléka a premixu vitamínů a minerálů (označení skupiny L). Kompletní krmná směs pro myši a potkany obsahovala pšenici, oves, pšeničné klíčky, sójovou moučku, extrudovanou sóju, kukuřici, sušené mléko, sušenou syrovátku, sušené kvasnice, mletý vápenec, dihydrogenfosforečnan vápenatý, chlorid sodný, L-lyzin a premix vitamínů a minerálů.

Pro následujících 7 týdnů byla zvířata náhodně rozdělena do 4 skupin po 10 kusech. Jedna skupina zůstala na dietě L (kontrolní skupina), další skupiny dostávali základní krmivo s 6% přídatkem olejů. Druhá skupina dostávala dietu S, která obsahovala základní krmnou směs obohacenou o světlicový olej (světlice barvířská, *Carthamus tinctorius* L.), třetí skupina byla krmena dietou R, která obsahovala MYPO spolu s rybím olejem (komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*), a poslední skupina dostávala dietu D, která obsahovala MYPO a olej extrahovaný z řasy *Schizochytrium* (DHASCO vegetable oil from microalgae, DSM Nutritional Products North America, Parsippany, NY, USA).

Krmné směsi byly zpracovány v míchací laboratoři v pavilonu M MENDELU a ručně byly vytvořeny krmné dávky o hmotnosti 200 g.

Tab. 2: Celkové složení krmných směsí (přepočteno na 1 kg směsi)

	SLOŽENÍ (g.kg ⁻¹)						
	MYPO	Salko	Hovězí lůj	Premix	Světlicový olej	Rybí olej	Olej z řasy
L	380	200	400	20	-	-	-
S	940	-	-	-	60	-	-
R	940	-	-	-	-	60	-
D	940	-	-	-	-	-	60

Tab. 3: Množství živin v krmných směsích (přepočteno na 1 kg směsi)

	ŽIVINY (g.kg-1)				Metabolizovatelná energie (MJ.kg-1)
	Hrubý protein	Tuk	Hrubá vláknina	Bezdušikaté látky	
L	145	208	26	621	18,9
S	228	85	48	639	15,8
R	228	85	48	639	15,8
D	228	85	48	639	15,8

4.2 Experimentální část

Celý experiment se uskutečnil v rámci projektu Vliv kyseliny dokosaheptaenové na markery zánětu u modelového organismu Interní grantové agentury AF MENDELU. V rámci tohoto projektu kolegové pracovali na určení koncentrace cytokinů (IL-10, -6, TNF- α , TGF β) a adiponektinu. Také provedli detekci proteinů (β -aktin, adiponektin, PPAR γ a NF- κ B) pomocí Western blot analýzy. Mým úkolem bylo podílet se na následujících procesech.

Po ukončení výkrmu a po 12 hodinách půstu byli potkani uvedeni do narkózy pomocí inhalačního anestetika isofluranu. Pokusným zvířatům byl punkcí ze srdce odebrán vzorek krve do heparinových zkumavek. Poté byli potkani usmrceni předávkováním anestetika a byli jim odebrány alikvotní vzorky jater a viscerální tukové tkáně pro další analýzy.

4.2.1 Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie

Vzorky:

- lyofilizované vzorky jater
- vzorky viscerální tukové tkáně
- vzorky krmiva

Reagencie:

- hexan:2-propanol (3:2 HIP1, 7:2 HIP2)
- Na₂SO₄
- roztok vnitřního standardu (10:0)
- butylhydroxytoluen
- CH₃ONa (0,5 M)
- 14% roztok BF₃ v CH₃OH
- isooktan
- nasycený vodný roztok NaCl
- PUFA č. 2 (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Vybavení:

- homogenizátor (Moulinex modelu D56, Moulinex, Francie)
- ultrazvukové zařízení PS 10000 (Notus-Powersonic, Vráble, Slovensko)
- chromatograf HP 6890 (Hewlett-Packard)
- kapilární kolona Innovax (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm, Agilent Technologies, J & W Scientific, Santa Clara, CA, USA)
- rotační vakuová odparka (RV 05-ST modelu 1P-B, IKA Labortechnik, Staufen, Německo)

Vzorky jater nebo tukové tkáně se zhomogenizovaly a přenesly do Erlenmeyerovy baňky (150 ml). Ke vzorkům se přidalo 30 ml hexan:2-propanolu (HIP1) a směs se vystavila 15 min působení ultrazvuku. Extrakt se zfiltraval přes Büchnerovu nálevku a přidalo se k němu 24 ml Na₂SO₄. Po protřepání a separování dělicích vrstev se vrstva s n-hexanem zfiltravala přes bezvodný roztok Na₂SO₄ do odměrné baňky (50 ml). Extrakty se přelily do baňky s kulatým dnem (100 ml) a nechaly odpařit na rotační vakuové odparce při 40 °C. Odpaření bylo dokončeno v atmosféře dusíku a celkové množství lipidů bylo stanoveno gravimetricky.

Extrahované lipidy (50 mg) se smíchaly s 3 ml vnitřního standardu a 1 ml butylhydroxytoluenu. Po 5 min sonikace byly přidány 2 ml CH_3ONa a směs se nechala 5 min hřát ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Přes kondenzátor se přidaly 2 ml 14% roztoku BF_3 v CH_3OH a směs se nechala zahřívát dalších 5 min. Po ochlazení vzorku se přidaly 2 ml isooktanu, směs se protřepala a nechala 1 min stát. Dále se přidalo 5 ml nasyceného vodného roztoku NaCl a směs se ještě před vychladnutím protřepala. Odebrala se organická vrstva a 1 ml byl přenesen do kolonky pro plynovou chromatografii. Estery MK byly separovány prostřednictvím chromatografu HP 6890 na kapilární koloně Innovax ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm}$). Teplota injektoru byla $360 \text{ }^\circ\text{C}$ a detektoru $275 \text{ }^\circ\text{C}$. Teplotní podmínky byly následující: $150 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ min}$, zvyšování teploty o $10 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ min}$ do dosažení $200 \text{ }^\circ\text{C}$, zvyšování teploty o $3 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ min}$ do dosažení $260 \text{ }^\circ\text{C}$, $260 \text{ }^\circ\text{C}/3 \text{ min}$. Jako nosný plyn byl použit N_2 , byl udržován průtok $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, tlak 145 kPa a dělicí poměr 60:1. Pro identifikaci esterů MK byl jako standard použit PUFA č. 2.

Obdobným způsobem jako se stanovily mastné kyseliny v jaterní a tukové tkáni, byly stanoveny i mastné kyseliny v krmivu.

4.2.2 Stanovení glykémie

Hladina plazmatické glukózy byla stanovena pomocí enzymatické kolorimetrie na automatizovaném chemickém analyzátoru BS400 (Mindray, Čína) s použitím komerčních kitů (Greiner Diagnostic GmbH, Německo).

4.2.3 Odběr vzorků pro expresi genů

Reagencie:

- *RNAlater* (Ambion)

Pro optimalizaci se odebralo 24 vzorků jater o max. velikosti $0,5 \text{ cm}$ ze 4 kontrolních potkanů. Vzorky se vložily do $1,5 \text{ ml}$ zkumavek (5 zkumavek od každého potkana po $40 - 60 \text{ mg}$, 6. zkumavka 5 – 6 kousků) s 1 ml *RNAlateru*. Pro testování se odebralo 120 vzorků o max. velikosti $0,5 \text{ cm}$ od 40 vykrmených potkanů. Vzorky byly opět vloženy do $1,5 \text{ ml}$ zkumavek (2 zkumavky od každého potkana po $40 - 60 \text{ mg}$, 3. zkumavka 5 – 6 kousků). Všechny zkumavky se poté doplnily *RNAlaterem* až po okraj. Následně byly zkumavky přes noc uloženy v lednici při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$, aby *RNAlater* mohl penetrovat do vzorku, a nakonec byly zkumavky zamraženy při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.4 Izolace RNA pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) - modifikovaný protokol

Vzorky:

- vzorky jater (30 mg)

Reagencie:

- QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA)
- RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA): 1 kolonka/vzorek, pufr RW1, RPE, RNase-free voda, 1 sběrná zkumavka, 1,5 ml zkumavka
- chloroform
- 70% ethanol

Vybavení:

- homogenizátor FastPrep
- centrifuga (Mikro 200, Hettich)
- chlazená centrifuga (4 °C)
- spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)

Před samotnou izolací byl vzorek jater vyjmut z *RNAlateru*, osušen a vložen do lyzačního roztoku. Do předem nachystaných zkumavek o objemu 2 ml se skleněnými kuličkami (0,2 ml malých a 0,2 ml velkých skleněných kuliček) se přidal 1 ml QIAzol Lysis Reagentu a 30 mg jater nakrájených na kousičky. Zkumavky se homogenizovaly ve FastPrepu 2 × 10 s na 6. stupeň. Mezi jednotlivými kroky byla směs chlazená (aby nedošlo k degradaci RNA) a následně centrifugována (5 min/13 684 × g) při 4 °C. Poté byl lyzát přepipetován do čisté zkumavky o objemu 1,5 ml a odložen na 5 min při pokojové teplotě (15 – 25 °C, aby došlo k disociaci nukleoproteinových komplexů). K lyzátu se přidal 200 µl chloroformu, směs se důkladně protřepala (15 s) a opět nechala stát 2 – 3 min při pokojové teplotě. Následně byla směs centrifugována (15 min/16 060 × g) při 4 °C. Horní vodná fáze se přepipetovala do čisté zkumavky o objemu 1,5 ml a přidal se k ní stejné množství 70% ethanolu (cca 400 – 450 µl). Směs se zvortexovala, aby se předešlo sraženinám. Následně bylo odebráno max. 700 µl směsi do kolonky umístěné ve sběrné zkumavce, zcentrifugováno (15 s/9 503 × g) při pokojové teplotě (program 1) a ze sběrné zkumavky se odstranil odpad. Zbylá směs se znovu napipetovala do kolonky jako v předcházejícím kroku a po centrifugaci se odpad odstranil. Do kolonky se napipetovalo 700 µl pufru RW1, směs se zcentrifigovala (15 s/9 503 × g)

a odpad ze sběrné zkumavky se odstranil. Do kolonky se napipetovalo 500 μ l pufru RPE, směs se zcentrifugovala (15 s/9 503 \times g) a odpad ze sběrné zkumavky se odstranil. Znovu se do kolonky napipetovalo 500 μ l pufru RPE, směs se zcentrifugovala (15 s/9 503 \times g), kolonka se vložila do čisté sběrné zkumavky o objemu 2 ml a směs se dodatečně zcentrifugovala (1 min/16 060 \times g). Kolonka se opět vložila do čisté zkumavky o objemu 1,5 ml, přidalo se do ní 30 – 50 μ l RNA-free vody, směs se zcentrifugovala (1 min/9 503 \times g) a odpad se odstranil. Znovu se do kolonky přidalo 30 – 50 μ l RNA-free vody, směs se zcentrifugovala (1 min/9 503 \times g) a odpad se odstranil. Výsledná koncentrace izolované RNA byla měřena pomocí spektrofotometru. Získaný izolat se uchovával při -80 °C.

4.2.5 Kontrola izolace RNA pomocí gelové elektroforézy

Vzorky:

- izolovaná RNA

Reagencie:

- 10 \times FA pufr
- 37% formaldehyd (12,3 M)
- ethidiumbromid (0,5 mg/ml)
- agaróza
- voda (ddH₂O)
- 5 \times RNA nanášecí pufr

Vybavení:

- vanička na gel
- elektroforetická vana se zdrojem

Kvalita izolované RNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy na 1,2% agarózovém gelu. Postup přípravy gelu o objemu 50 ml byl následující: Do Erlenmeyerovy baňky se pomocí hodinového sklíčka navážilo 0,6 g agarózy, přidalo se 5 ml 10 \times FA pufru a doplnilo 45 ml destilované vody. Poté byla směs důkladně rozmíchána a rozvařena, následně byla ochlazená na 65 °C a bylo k ní přidáno 0,9 ml formaldehydu a 12,0 μ l ethidiumbromidu. Směs se nalila do vaničky, kde se nechala ztuhnout. Gel ve vaničce se vložil do elektroforetické vany, zalil se 1 \times FA pufrem, připraveným dle tab. 4, a nechal se 30 min stát. Mezitím se vzorek RNA smíchal s 5 \times RNA nanášecím pufrem,

inkuboval se 3 – 5 min při 65 °C, poté se zchladil a nanesl na gel (4 µl). Elektroforéza probíhala při napětí 4 V.cm⁻¹.

Postup přípravy RNA nanášecího pufru a 10 × FA pufru je uvedený v Omniscript® Reverse Transcription Handbook (Qiagen).

Tab. 4: Složení elektroforetického 1 × FA pufru

	1000 ml	500 ml	150 ml
10 × FA pufr	100 ml	50 ml	15 ml
formaldehyd	20 ml	10 ml	3 ml
voda	880 ml	440 ml	132 ml

4.2.6 Reverzní transkripce

Vzorky:

- izolovaná RNA

Reagencie:

- Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA): 10 x RT pufr, dNTP mix, Reverse Transcriptase, RNase-free voda
- oligo dT (komplementární k poly-A 3' konci na mRNA)
- inhibitor RNáz

Vybavení:

- pracovní box

Všechny reagencie byly rozmrazeny při pokojové teplotě, poté ihned uloženy na led. Aby se předešlo degradaci, byla RNA rozmrazena až těsně před přidáním do reakční směsi, poté byla ihned opět zmrazena. V PCR zkumavce na ledu bylo připravováno 20 µl reakční směsi (dle tab. 6) a reakční směs se nechala inkubovat 60 min při 37 °C. Získaná cDNA se uchovávala při -20 °C.

Tab. 5: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci (20 μ l)

SLOŽKA	OBJEM
H ₂ O	do 20 μ l
10 \times RT pufř	2,0 μ l
dNTP mix (5M každý)	2,0 μ l
oligo dT (10 μ M)	2,0 μ l
inhibitor RNáz (10 U/ μ l)	1,0 μ l
Omniscript Reverse Transkriptase	1,0 μ l
RNA	1 μ g

4.2.7 Real-time PCR

Vzorky:

- cDNA

Reagencie:

- Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 147 Carlsbad, CA, USA)
- AmpErase® Uracyl N-glycosylase (Applied Biosystems, 147 Carlsbad, CA, USA)
- primery (10 pmol/ μ l)
- PCR H₂O (Top-Bio)

Vybavení:

- pracovní box
- přístroj 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 147 Carlsbad, CA, USA)

Primery (tab. 7) pro real-time PCR byly navrhované na základě dostupných referenčních sekvencí a odborných publikací. Primery pro cílové geny navrhl Ing. Ondřej Škul-téty, primery pro *ATCB* prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D. Získaná cDNA se nejprve pou-žila pro ověření primerů. Specificita primerů se ověřila pomocí disociační křivky za následujícího teplotního profilu: 15 s/95 °C, 1 min/60 °C, 30 s/95 °C, 15 s/60 °C. Speci-fita každého fragmentu se ověřila gelovou elektroforézou a sekvenováním PCR produk-tu s využitím BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu a sekvenátoru ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tab. 6: Sekvence primerů

GEN	TYP PRIMERU	SEKVENCE PRIMERU (5' → 3')
<i>PPARγ</i>	přímý	CCCTGGCAAAGCATTGTATG
	zpětný	ATCGAAACTGGCACCCCTTGA
<i>GPR120</i>	přímý	CCCAACCGCATAGGAGAAATC
	zpětný	ACACTCGGATCTGGTGGCTCT
<i>AdipoR1</i>	přímý	GATGTTCTTCCTGGGTGCAGTG
	zpětný	CAGAGATGCCCAGGACACAGAC
<i>AdipoR2</i>	přímý	ATCTGTGTGCTGGGCATTGC
	zpětný	AGCCAGCCTATCTGCCCTATG
<i>ACTB</i>	přímý	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
	zpětný	GTTTCATGGATGCCACAGGATT

Efektivita reakce byla stanovena pomocí standardní křivky, která byla získána dekadickým ředěním vstupní cDNA. Pro všechny vzorky byla připravena reakční směs dle následující tab. 7.

Tab. 7: Reakční směs pro real-time PCR (20 μ l)

SLOŽKA	OBJEM
H ₂ O	8,4 μ l
UNG	0,2 μ l
SYBR Green	10,0 μ l
mix primerů	0,4 μ l
cDNA	1 μ g

Všechny amplifikace PCR produktů v reálném čase byly provedeny na přístroji 7500 Real-time System (Applied Biosystems). Teplotní profil reakcí byl následující:

Cílové geny: 2 min/50 °C, 10 min/95 °C, 40 \times 15 s/95 °C, 1 min/60 °C
ACTB: 2 min./50 °C, 10 min/95 °C, 40 \times 15 s/95 °C, 30 s/65 °C,
30 s/60 °C

Naměřená data C_T hodnot byla analyzována jako referenční hodnota pro relativní množství exprese genu. Relativní změny v expresi testovaných genů u potkanů s experimentální dietou (S, R, D) byly vypočteny ve vztahu k úrovni exprese odpovídajících genů u potkanů s dietou L pomocí softwaru qbase+ (Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgie). Výsledky analýzy genové exprese byly zpracovány pomocí programu Excel 2007 (Microsoft).

Pro normalizaci dat bylo vybráno 7 kandidátních genů, získaná data po optimalizaci PCR byla vyhodnocena pomocí programu geNorm (součástí qbase+).

4.2.8 Statistické analýzy

Hodnocení všech výsledků mimo genové exprese bylo zpracováno v programu STATISTICA 12 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Při statistickém vyhodnocování byla použita metoda jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyův post-hoc test.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Průměrná spotřeba krmiva

Průměrný denní příjem krmiva byl u všech skupin podobný, tj. rozdílné složení krmných směsí nemělo na příjem krmiva průkazný vliv ($P>0,05$, tab. 8).

Tab. 8: Průměrná spotřeba krmiva

	Průměrný příjem krmiva ve skupině (g.den ⁻¹)	Průměrný příjem krmiva na jednotlivce (g.den ⁻¹)
L	115 ^a	23,0 ^a
S	156 ^a	31,2 ^a
R	151 ^a	30,2 ^a
D	135 ^a	27,0 ^a

Pozn. Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny (a) se průkazně neliší ($P>0,05$).

Dle studií autorů Yamazaki a kol. (2011), Lu a kol. (2011) jsme předpokládali, že příjmy krmiv u jednotlivých skupin budou stejné. Naše naměřené hodnoty tento předpoklad potvrdily. Dokonce byl příjem u skupiny L mírně nižší, ačkoli konečná živá hmotnost (tab. 9) byla u této skupiny největší (pravděpodobně důsledkem vyššího obsahu metabolizovatelné energie viz. tab. 3).

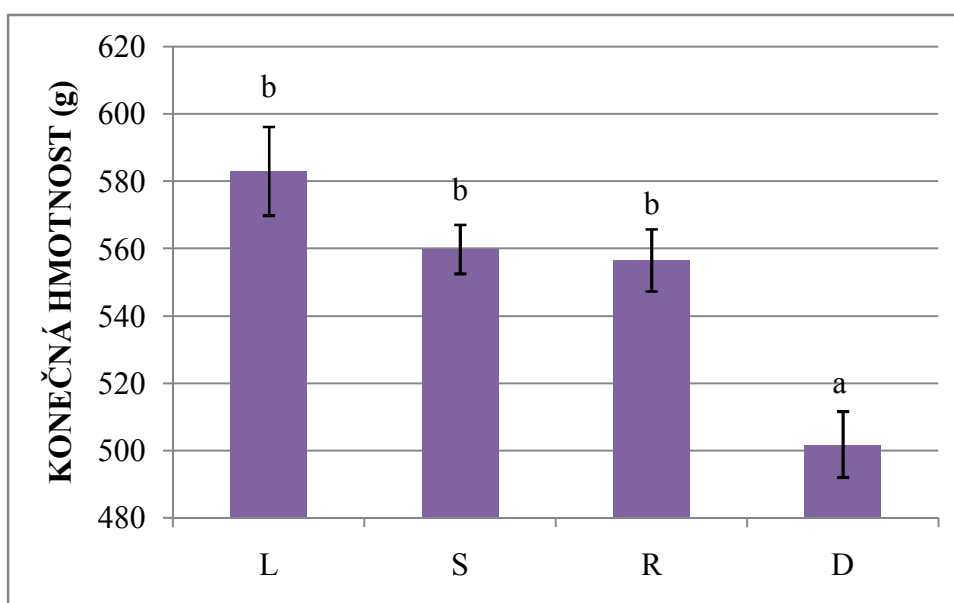
5.2 Živá hmotnost potkanů, hmotnost jater a viscerální tukové tkáně

Průměrná živá hmotnost potkanů po 7 sedmi týdnech výkrmu základní dietou L byla u všech přibližně stejná, tj. 464 ± 4 g ($P>0,05$). Po dalších 7 týdnech výkrmu experimentálními dietami L, S, R a D došlo pouze u skupiny D k průkaznému snížení ($P<0,05$, obr. 10) hmotnosti potkanů. Průměrný denní přírůstek v 7 týdnech výkrmu experimentální dietou byl průkazně nižší u skupiny D ($P<0,05$, obr. 11) oproti skupinám L a R. U skupiny S nebyl zjištěn rozdíl v přírůstku hmotnosti oproti dalším skupinám L, R a D ($P>0,05$, obr. 11). Hmotnost jater se mezi skupinami průkazně nelišila ($P>0,05$, tab. 9). Hmotnost viscerální tukové tkáně měla tendenci klesat u skupiny S a R ($P>0,05$), u skupiny D se hmotnost tukové tkáně průkazně snížila ($P<0,05$).

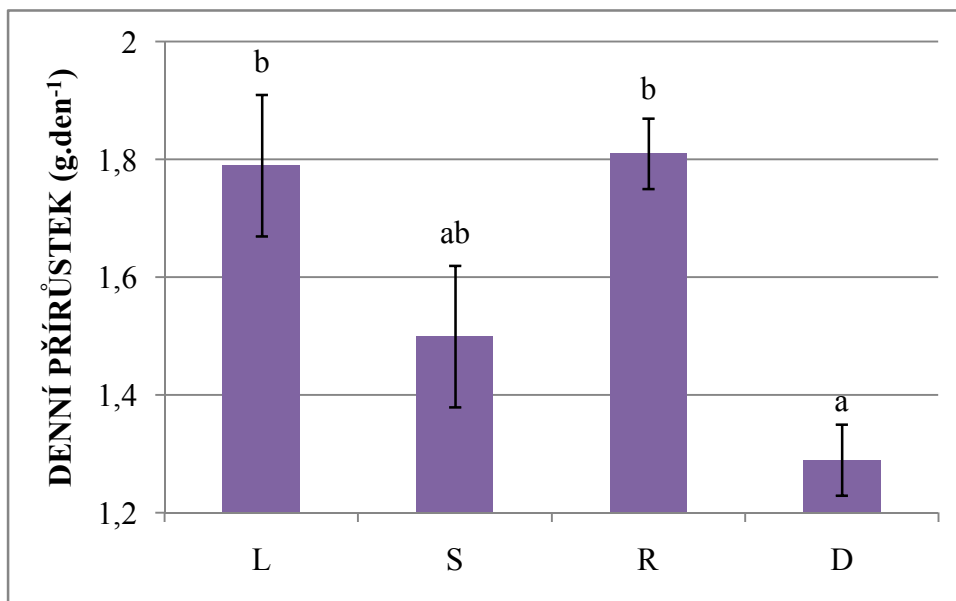
Tab. 9: Průměrná živá hmotnost potkanů, přírůstek hmotnosti, hmotnost jater a viscerální tukové tkáně

	Hmotnost 3/3 (g)	Hmotnost 22/4 (g)	Hmotnost 16/6 (g)	Denní přírůstek 22/4 – 16/6 (g)	Hmotnost jater (g)	Hmotnost tuku (g)
L	300,4 ± 8 ^a	486,0 ± 9 ^a	583,0 ± 13 ^b	1,79 ± 0,1 ^b	17,5 ± 0,6 ^a	15,1 ± 1,0 ^b
S	294,6 ± 6 ^a	478,4 ± 6 ^a	559,8 ± 7 ^b	1,50 ± 0,1 ^{ab}	16,4 ± 0,3 ^a	11,1 ± 0,7 ^{ab}
R	294,6 ± 7 ^a	458,9 ± 9 ^a	556,5 ± 9 ^b	1,81 ± 0,1 ^b	17,5 ± 0,2 ^a	11,0 ± 0,6 ^{ab}
D	293,8 ± 4 ^a	432,2 ± 7 ^a	501,8 ± 10 ^b	1,29 ± 0,1 ^a	16,0 ± 0,5 ^a	9,7 ± 0,6 ^a

Pozn. Hodnoty ve sloupcích označené různými písmeny (a, b) se průkazně liší (P<0,05).



Obr. 10: Průměrná konečná živá hmotnost (g) potkanů, krmených dietou s hovězím lojem (L), s 6% obsahem oleje ze světlice barvířské (S), s 6% obsahem rybího oleje (R, komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*) a 6% obsahem oleje z řasy rodu *Schizochytrium* (D) v uvedeném pořadí; hodnoty značené různými písmeny (a, b) se průkazně liší (P<0,05; zjištěno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova testu)



Obr. 11: Průměrný denní přírůstek (g.den⁻¹) potkanů, krmených dietou s hovězím lojem (L), s 6% obsahem oleje ze světlice barvířské (S), s 6% obsahem rybího oleje (R, komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*) a 6% obsahem oleje z řasy rodu *Schizochytrium* (D) v uvedeném pořadí v období 22/4 – 16/6; hodnoty značené různými písmeny (a, b) se průkazně liší ($P < 0,05$; zjištěno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova testu)

Naším cílem bylo navození mírné obezity u potkanů, čímž jsme chtěli humánně podpořit rozvoj zánětu, resp. aterosklerózy. Pokud naše výsledky porovnáme se studií autorů Sakai a kol. (2013), dojdeme k závěru, že se nám podařilo navodit stav mírné obezity. Ve zmíněné studii dosáhli autoři 7% nárůstu hmotnosti oproti kontrolní skupině. Ve své práci definovali odvozením z jiných studií rozmezí nárůstu hmotnosti pro 2 kategorie: střední obezitu (10 – 25 %) a těžkou obezitu (> 40 %). Z tohoto lze usuzovat, že procentuální nárůst nižší než 10 % odpovídá stavu mírné obezity. V našem případě byl nárůst hmotnosti u skupiny L roven 5 % oproti skupině S, která se dá považovat za neutrální. Tento procentuální nárůst tedy odpovídá mírné obezitě.

Ve studii autorů Yamazaki a kol (2011) neprokázali žádný vliv přídavku rybího tuku v dietě na konečnou hmotnost potkanů, ale ve studii autorů Lu a kol (2011) došlo ke snížení živé hmotnosti u potkanů krmených dietou s přídavkem rybího tuku. Naše výsledky, že snížení hmotnosti u skupiny R bylo oproti kontrole neprůkazné, se s údaji z těchto studií shodují.

Naproti tomu studie autorů Fedorova-Dahms a kol. (2011a, 2011b) neprokázala žádný vliv diety s přidavkem oleje z řasy rodu *Schizochytrium* na živou hmotnost potkanů. Naše výsledky se se zjištěním autorů Fedorova-Dahms a kol. (2011a, 2011b) neshodují. Ačkoli všechna uvedená krmiva obsahovala stejné množství metabolizovatelné energie (tab. 3) a příjem krmiv nebyl u skupiny D průkazně nižší ($P>0,05$, tab. 9), došlo k průkaznému snížení živé hmotnosti potkanů vlivem DHA u skupiny D ($P<0,05$, tab. 9).

5.3 Stanovený obsah mastných kyselin v krmivu

Každodenní příjem EPA a DHA byl u diety L a S minimální. U diety R činil 227,8 a 206,5 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti a u diety D byl 32,2 a 871,3 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti. Těmto údajům odpovídalo i stanovení MK v krmivu (tab. 11). V dietě L byly ve velkém množství zastoupeny kyseliny palmitová (16:0), stearová (18:0) a olejová (18:1), zatímco množství kyselin n-3 se blížilo 0. Dieta S obsahovala nejvíce množství kyseliny linolové (18:2), také větší množství kyseliny palmitové (16:0) a olejové (18:1), kyseliny n-3 byly zastoupeny ve stopovém množství. V dietě R bylo naměřeno větší množství kyselin palmitové (16:0), olejové (18:1) a linolové (18:2), ale také patrné množství kyseliny eikosapentaenové (20:5) a dokosahexaenové (22:6). Vysoký obsah EPA a DHA v rybím oleji je všeobecně známý. V dietě D byl obsah všech MK, vyjma DHA (22:6), nižší oproti R. Jak vidíme na grafu (obr. 12) v dietách L a S nebyl průkazný rozdíl, co se obsahu EPA a DHA týče ($P>0,05$). Obsah EPA byl průkazně vyšší v dietě D oproti L a S ($P<0,05$). A v dietě R byl průkazně vyšší oproti D ($P<0,05$). Obsah DHA byl průkazně vyšší v dietě R oproti L a S ($P<0,05$). V dietě D byl obsah DHA průkazně vyšší než v R ($P<0,05$). Celkový obsah EPA a DHA byl srovnatelný v dietě R a D ($P>0,05$).

Tab. 10: Příjem EPA a DHA v posledním týdnu experiment. výkrmu

	KAŽDODENNÍ PŘÍJEM (mg.kg ⁻¹ živé hmotnosti)		
	EPA	DHA	EPA + DHA
L	0,2	0,1	0,03
S	3,4	4,5	7,9
R	227,8	260,5	488,3
D	32,2	871,3	903,5

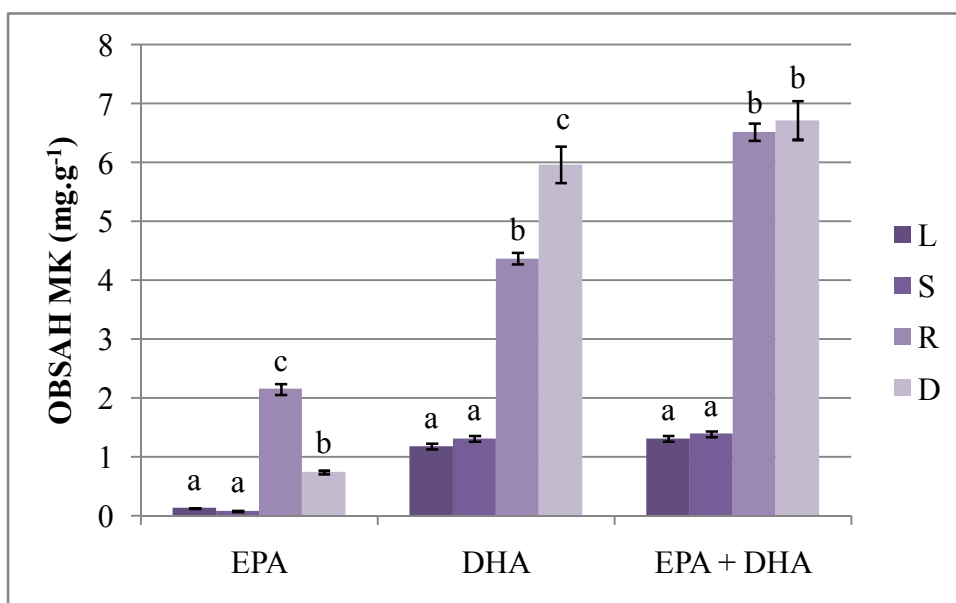
Tab. 11: Obsah MK v krmivu (% podíl z celk. obsahu MK)

OBSAH MK (%)										
	myristová	palmitová	stearová	olejová	linolová	α-linolenová	eikosapentaenová	dokosapentaenová	dokosahexaenová	
	14:0	16:0	18:0	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-3)	20:5 (n-3)	22:5 (n-3)	22:6 (n-3)	EPA + DHA
L	4,5	27,5	27,9	33,7	5,6	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
S	0,5	10,5	2,9	17,9	65,7	1,1	0,4	0,4	0,6	1,0
R	4,6	18,2	3,9	26,3	19,9	4,3	8,4	2,5	11,9	20,3
D	4,4	17,5	2,8	21,6	19,0	1,7	2,0	1,9	29,1	31,1

Tab. 12: Obsah EPA a DHA v krmivu

OBSAH MK (mg.g⁻¹)			
	EPA	DHA	EPA + DHA
L	0,13 ± 0,006 ^a	1,18 ± 0,050 ^a	1,31 ± 0,050 ^a
S	0,08 ± 0,007 ^a	1,31 ± 0,050 ^a	1,39 ± 0,050 ^a
R	2,15 ± 0,089 ^c	4,37 ± 0,099 ^b	6,52 ± 0,150 ^b
D	0,74 ± 0,030 ^b	5,97 ± 0,310 ^c	6,72 ± 0,330 ^b

Pozn. Hodnoty ve sloupcích označené různými písmeny (a, b, c) se průkazně liší (P<0,05).



Obr. 12: Obsah (mg.g⁻¹) kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) v krmivu, obsahujícím hovězí lůj (L), 6 % oleje ze světlice barvířské (S), 6 % rybiho oleje (R, komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*) a 6 % oleje z řasy rodu *Schizochytrium* (D) v uvedeném pořadí; hodnoty značené různými písmeny (a, b, c) se průkazně liší ($P < 0,05$; zjištěno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova testu)

5.4 Obsah mastných kyselin v tukové tkáni a játrech

Obsah MK (mg.g⁻¹) ve viscerální tukové tkáni a v játrech je zobrazený v tabulkách 12 a 13. Jak je vidět z grafu (obr. 13), obsah EPA a DHA se nelišil u skupin L a S ($P > 0,05$), stejně jako obsah EPA a DHA v krmivu u těchto skupin. Průkazně vyšší obsah EPA byl u skupiny D oproti L a S ($P < 0,05$) a průkazně nejvyšší byl obsah EPA u skupiny R ($P < 0,05$), tyto výsledky se shodovaly u stanovení v tukové tkáni i v játrech. Obsah DHA se v jednotlivých tkáních lišil, až 5 × více DHA bylo naměřeno v tukové tkáni. Obsah DHA byl průkazně nejvyšší u skupiny D ($P < 0,05$) oproti ostatním skupinám L, S a R. Celkový obsah EPA + DHA v játrech odpovídal obsahu EPA + DHA v krmivu. Naopak v tukové tkáni byl průkazný rozdíl v celkovém obsahu EPA + DHA mezi skupinami R a D ($P < 0,05$).

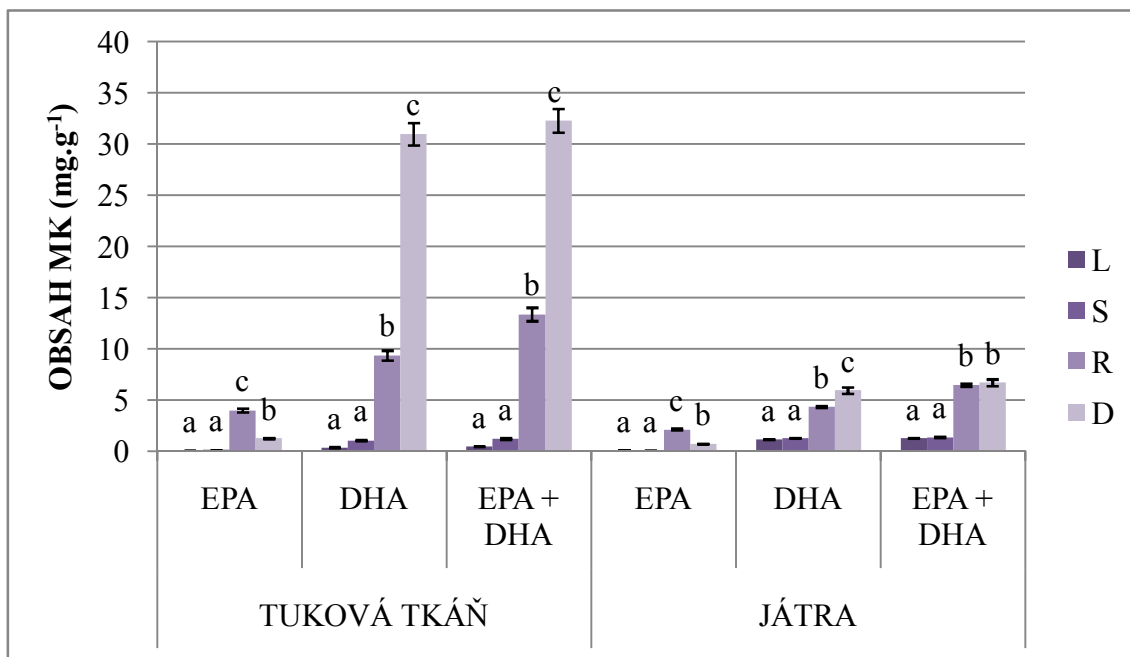
Tab. 13: Průměrný obsah MK ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) ve viscerální tukové tkáni

	L	S	R	D
myristová 14:0	19,52 ± 0,28	11,02 ± 0,72	17,73 ± 0,21	17,17 ± 0,32
palmitová 16:0	164,56 ± 1,80	139,94 ± 3,96	166,17 ± 1,18	162,96 ± 1,75
stearová 18:0	51,26 ± 0,90	37,77 ± 0,97	41,28 ± 0,37	39,52 ± 0,72
olejová 18:1 (n-9)	337,96 ± 4,13	261,82 ± 5,03	315,90 ± 2,55	293,27 ± 4,20
LA 18:2 (n-6)	79,27 ± 1,89	244,10 ± 5,53	153,51 ± 2,24	150,98 ± 2,58
ALA 18:3 (n-3)	7,11 ± 0,12	11,30 ± 0,32	14,96 ± 0,14	14,24 ± 0,14
AA 20:4 (n-6)	0,91 ± 0,07	3,57 ± 0,15	1,91 ± 0,08	4,08 ± 0,20
EPA 20:5 (n-3)	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,01	4,03 ± 0,19	1,29 ± 0,07
DPA 22:5 (n-3)	0,29 ± 0,02	0,66 ± 0,04	3,64 ± 0,19	1,97 ± 0,10
DHA 22:6 (n-3)	0,41 ± 0,04	1,08 ± 0,06	9,39 ± 0,48	30,98 ± 1,17
EPA + DHA	0,50 ± 0,04	1,24 ± 0,06	12,42 ± 0,64	32,27 ± 1,22
celkem	662,23 ± 4,47	712,18 ± 8,31	729,32 ± 3,34	717,23 ± 8,26

Tab. 14: Průměrný obsah MK ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) v játrech

	L	S	R	D
myristová 14:0	0,46 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01
palmitová 16:0	9,80 ± 0,48	8,41 ± 0,32	9,57 ± 0,17	9,30 ± 0,17
stearová 18:0	4,64 ± 0,13	4,50 ± 0,12	4,71 ± 0,09	4,36 ± 0,08
olejová 18:1 (n-9)	12,98 ± 0,91	5,87 ± 0,37	7,30 ± 0,19	5,99 ± 0,29
LA 18:2 (n-6)	4,10 ± 0,17	13,98 ± 0,82	7,62 ± 0,18	6,00 ± 0,16
ALA 18:3 (n-3)	0,24 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,39 ± 0,02
AA 20:4 (n-6)	2,84 ± 0,07	6,42 ± 0,15	2,65 ± 0,06	5,70 ± 0,10
EPA 20:5 (n-3)	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,01	2,15 ± 0,09	0,74 ± 0,03
DPA 22:5 (n-3)	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,04	1,38 ± 0,04	0,48 ± 0,03
DHA 22:6 (n-3)	1,18 ± 0,04	1,31 ± 0,06	4,37 ± 0,10	5,98 ± 0,33
EPA + DHA	1,31 ± 0,04	1,38 ± 0,06	6,52 ± 0,15	6,72 ± 0,35
celkem	36,63 ± 4,47	41,39 ± 8,31	40,58 ± 0,74	39,28 ± 0,95

Pozn. Zvýrazněné hodnoty v tabulkách 13 a 14 jsou znázorněny v grafu (obr. 13).

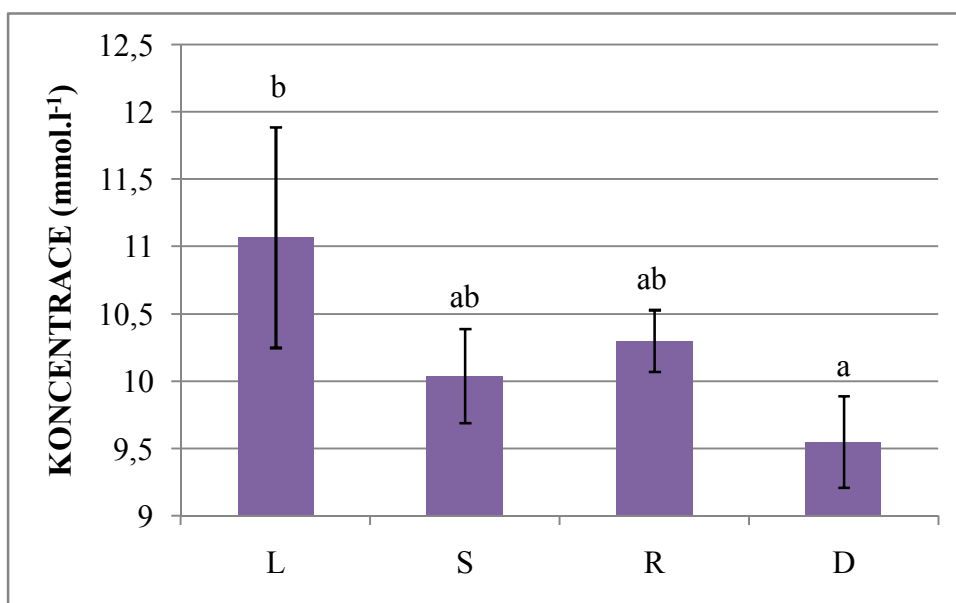


Obr. 13: Obsah ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) ve viscerální tukové tkáni a játrech potkanů, krmených dietou s hovčím lojem (L), s 6% obsahem oleje ze světlice barvířské (S), s 6% obsahem rybího oleje (R, komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*) a 6% obsahem oleje z řasy rodu *Schizochytrium* (D) v uvedeném pořadí; hodnoty značené různými písmeny (a, b, c) se průkazně liší ($P < 0,05$; zjištěno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova testu)

Ačkoliv jsou játra zásobárnou tuků, větší množství mastných kyselin se ukládá v tukové tkáni, což je také patrné z grafu (obr. 13). Obsah MK ve viscerální tukové tkáni u skupiny R a D odpovídá obsahu mastných kyselin přijímaných v krmivu R a D. V játrech se u těchto dvou skupin celkově ukládalo méně mastných kyselin, největší rozdíl byl v obsahu DHA.

5.5 Hodnoty glykémie

Z grafu (obr. 14) lze vyčíst, že koncentrace glukózy v plazmě byla průkazně snižena u potkanů krmených dietou D ($P < 0,05$). U potkanů skupiny S a R bylo snížení koncentrace glukózy v plazmě neprůkazné ($P > 0,05$).

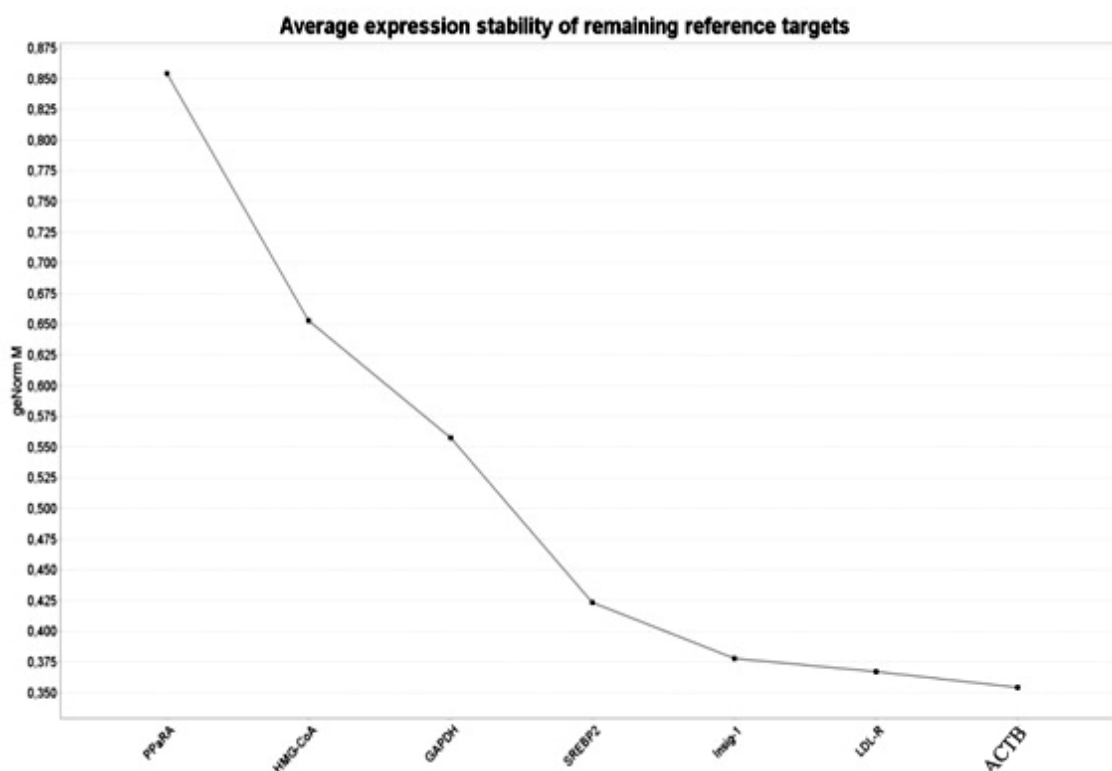


Obr. 14: Koncentrace glukózy v plazmě (mmol.l⁻¹) u potkanů, krmených dietou s hovězím lojem (L), s 6% obsahem oleje ze světlice barvířské (S), s 6% obsahem rybího oleje (R, komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*) a 6% obsahem oleje z řasy rodu *Schizochytrium* (D) v uvedeném pořadí; hodnoty značené různými písmeny (a, b) se průkazně liší ($P < 0,05$; zjištěno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova testu)

Hladina glykémie souvisí s obezitou, proto jsme předpokládali, že dojde ke snížení koncentrace glukózy v plazmě u potkanů krmených dietou S, R a D oproti potkanům ze skupiny L. Tento předpoklad byl potvrzen. Obdobných výsledků bylo dosaženo i ve studii autorů Sakai a kol. (2011), kde došlo ke snížení koncentrace glukózy o 10 % vzhledem ke kontrole, nebo ve studii autorů Yamazaki a kol (2011), kde byla zjištěna tendence ke snížení koncentraci glukózy u normálních i obézních potkanů, krmených rybím olejem. A ve studii autorů Ghibaudi a kol. (2011) se prokazatelně zvýšila koncentrace glukózy u potkanů, kteří byli krmení dietou s vysokým obsahem vepřového sádla. Tomuto zjištění odpovídá námi naměřená vysoká hladina glukózy u potkanů krmených hovězím lojem (tj. dieta L).

5.6 Exprese vybraných genů

Z vybrané skupiny genů byl jako vhodný referenční gen určený *ACTB*, který vykazoval největší stabilitu (obr. 15). Tento gen je tedy možné využít v rovnici pro výpočet genové exprese.



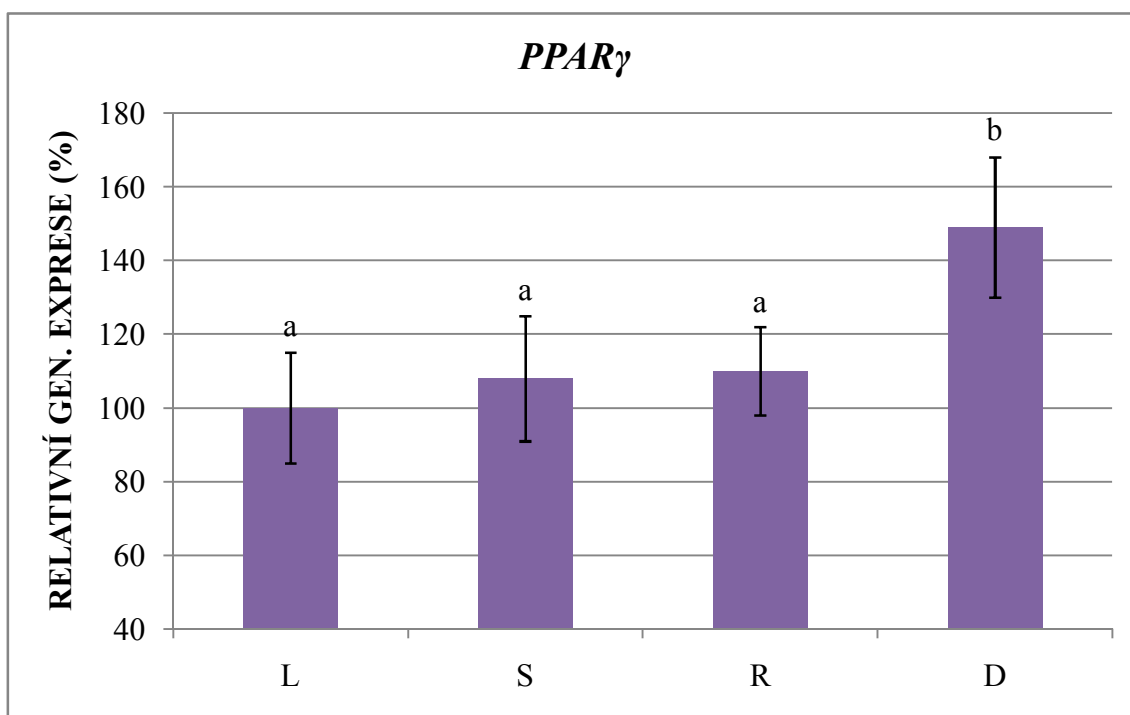
Obr. 15: Stabilita referenčních genů

Relativní exprese genu *PPAR γ* v játrech byla u potkanů krmených dietou L skoro o polovinu větší (tab. 15). Jak lze vidět v grafu (obr. 16), relativní exprese genu *PPAR γ* měla mírnou tendenci se zvyšovat u potkanů, krmených dietou S a R ($P > 0,05$), zatímco u potkanů s dietou D byla exprese genu *PPAR γ* průkazně vyšší ($P < 0,05$).

Tab. 15: Relativní genová exprese *PPAR γ*

	C_T hodnota <i>ACTB</i>	C_T hodnota <i>PPARγ</i>	Gen. exprese (qbase+)	Rel. genová exprese (%)
L	16,2 ± 0,18	25,90 ± 0,16	0,912 ^a	100 ± 15 ^a
S	16,0 ± 0,17	25,58 ± 0,13	0,981 ^a	108 ± 17 ^a
R	16,1 ± 0,18	25,52 ± 0,12	1,000 ^a	110 ± 12 ^a
D	15,9 ± 0,15	25,03 ± 0,13	1,357 ^b	149 ± 19 ^b

Pozn. Hodnoty ve sloupcích označené různými písmeny (a, b) se průkazně liší ($P < 0,05$).



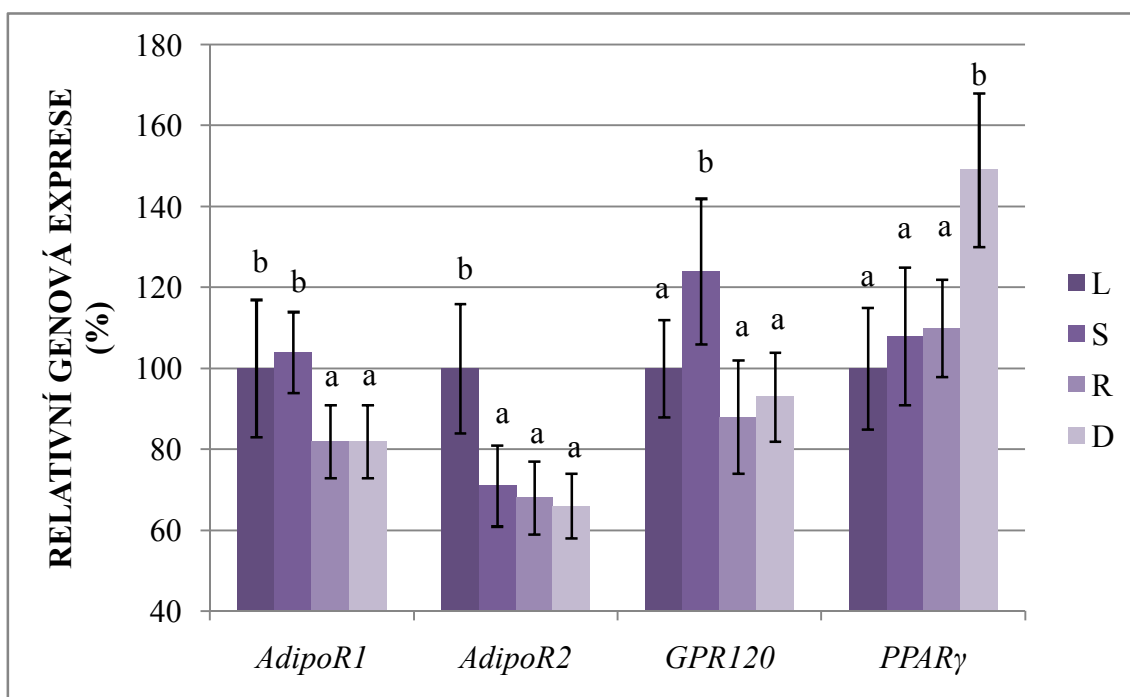
Obr. 16: Relativní gen. exprese *PPARγ* (%) u potkanů, krmených dietou s hovězím lojem (L), s 6% obsahem oleje ze světlice barvířské (S), s 6% obsahem rybího oleje (R, komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*) a 6% obsahem oleje z řasy rodu *Schizochytrium* (D) v uvedeném pořadí; hodnoty značené různými písmeny (a, b) se průkazně liší ($P < 0,05$; zjištěno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova testu)

Naším cílem bylo zjistit, zda rybí olej (EPA) a olej z řasy *Schizochytrium* (DHA) mají vliv na expresi genu *PPARγ* u potkanů. Pomocí qPCR jsme zjistili, že olej z řasy *Schizochytrium* má průkazný vliv na expresi *PPARγ* ($P < 0,05$), zatímco rybí olej měl pouze tendenci expresi *PPARγ* zvyšovat ($P > 0,05$). Naše výsledky se shodují s údaji, které byly dosaženy v obdobných studiích. Ve studii autorů González-Pérez a kol. (2009) byl zkoumán vliv n-3 nenasycených mastných kyselin na inzulínovou rezistenci a jaterní steatózu u obézních myší (*ob/ob*). Jedinci v experimentální skupině byli krmeni dietou s 6% obsahem n-3 PUFA. Výsledkem studie byl průkazný vliv na zvýšení exprese v tukové tkáni ($P < 0,05$) i v játrech ($P < 0,005$) u myší, kterým byly injikovány n-3 MK, oproti kontrole. Také ve studii autorů Draper a kol. (2011) byl zkoumán vliv EPA a DHA na expresi *PPARγ* v myších dendritických buňkách. Dendritické buňky vystavili mimo jiné působení EPA (25 μM) a DHA (25 μM) na 1 den. Po provedení pokusu zjistili, že EPA i DHA průkazně zvyšuje expresi *PPARγ* ($P < 0,05$ a $P < 0,001$). Další studie

autorů Oster a kol. (2010) pak zkoumala vliv DHA a EPA na adipocyty (3T3-L1). Studie zjistila vysoce průkazný vliv DHA na zvýšení exprese *PPAR γ* ($P < 0,01$), zatímco EPA měla pouze tendenci zvyšovat expresi *PPAR γ* . Studie autorů Murali a kol. (2014) rozvedla předchozí studii autorů Oster a kol. (2010) a zkoumala vliv EPA a DHA na preadipocyty (3T3-L1). Buňky během diferenciaci byly inkubovány v médiích s EPA (50 μM), DHA (50 μM) nebo EPA + DHA (30 μM + 20 μM). Výsledkem pokusu bylo zjištění, že u EPA, DHA i EPA + DHA došlo k průkaznému zvýšení exprese *PPAR γ* oproti kontrole ($P < 0,001$).

Zvýšená exprese genu *PPAR γ* u skupiny D v předkládané diplomové práci korespondovala i se zjištěním zvýšené hladiny plazmatického adiponektinu (což bylo předmětem jiné části experimentu). To souhlasí s daty získanými ve studii autorů Lefils a kol. (2010), která ukazuje, že DHA neovlivňuje hladinu adiponektinu v buňkách tukové tkáně u myši, ale průkazně zvyšuje hladinu plazmatického adiponektinu.

V rámci našeho experimentu se zkoumala i genová exprese dalších genů – *AdipoR1*, *AdipoR2* a *GPR120*. Jak vidíme na grafu (obr. 17), relativní genová exprese genu *AdipoR1* byla průkazně snížena u potkanů s dietou R a D ($P < 0,05$), u diety S měla genová exprese *AdipoR1* mírnou tendenci se zvyšovat ($P > 0,05$). Také relativní genová exprese genu *AdipoR2* byla průkazně snížena u potkanů s dietou S, R a D ($P < 0,05$). Genová exprese genu *GPR120* měla tendenci se snižovat u potkanů s dietou R a D. Zatímco u potkanů s dietou S byla genová exprese *GPR120* prokazatelně vyšší ($P < 0,05$).



Obr. 17: Relativní genová exprese *AdipoR1*, *AdipoR2*, *GPR120*, *PPARγ* (%) u potkanů, krměných dietou s hovězím lojem (L), s 6% obsahem oleje ze světlice barvířské (S), s 6% obsahem rybiho oleje (R, komerčně dostupný *Jecoris aselli oleum*) a 6% obsahem oleje z řasy rodu *Schizochytrium* (D) v uvedeném pořadí; hodnoty značené různými písmeny (a, b) se průkazně liší ($P < 0,05$; zjištěno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Tukeyova testu)

Podrobněji se genové expresi těchto genů věnuje ve své diplomové práci kolegyně Bc. Nikola Zamazalová, já jsem provedla jen zběžné hodnocení. Pokud porovnáme relativní expresi všech genů, je patrné, že dieta D (DHA) zvýšila pouze expresi genu *PPARγ*. Relativní expresi ostatních genů dieta D průkazně snížila. Dieta R (EPA) měla tendenci zvýšit jen expresi *PPARγ*, u genů pro adiponektin (*AdipoR1* a *AdipoR2*) expresi průkazně snížila a expresi genu *GPR120* měla tendenci snižovat. Jelikož neexistují podobné studie je porovnání s jejich výsledky nemožné. Ačkoli n-3 PUFA po navázání na receptory GPR120 (YOUNG OH A KOL. 2010) *AdipoR1* a *AdipoR2* (FLOCK A KOL. 2013) mají protizánětlivý účinek, jejich efekt na expresi genu je neprobádanou oblastí a zajímavou příležitostí pro vědce.

6 ZÁVĚR

Moje diplomová práce byla zaměřená na vliv polynenasycených mastných kyselin n-3 na expresi genů, které hrají roli v rozvoji zánětu a kardiovaskulárních onemocnění. V teoretické části jsem se soustředila na vymezení pojmu lipidů a mastných kyselin, jejich klasifikaci, metabolismus a biologické funkce. Dále jsem probrala vliv polynenasycených mastných kyselin na zdraví člověka a formulovala jsem zánět a kardiovaskulární onemocnění. Podrobně jsem se zaměřila na vliv polynenasycených mastných kyselin na expresi genů, které ovlivňují rozvoj zánětu a aterosklerózy. Také jsem charakterizovala analytické metody, které jsme využili pro stanovení obsahu mastných kyselin, a metody molekulární biologie, pomocí kterých jsme detekovali a kvantifikovali exprese genů. V praktické části jsem stanovila obsah mastných kyselin, hladinu glykémie a sledovala jsem exprese vybraných genů, hl. *PPAR γ* .

Má diplomová práce byla součástí projektu (financovaného Interní grantovou agenturou AF MENDELU), jehož cílem bylo ověřit hypotézu o potenciálu DHA jako nutri- ceutika schopného zabránit v dostatečně dlouhém časovém intervalu navození stavu mírného chronického zánětu v organizmu, tj. funkce DHA snížit riziko vzniku atero- sklerózy (kardiovaskulárního onemocnění) dietární intervencí. Ověřit, že DHA je v tomto procesu účinnější než EPA. Konkrétně mým úkolem bylo ověřit hypotézu, že DHA zvyšuje expresi genu *PPAR γ* .

Jako modelový organizmus pro pokus byl vybrán laboratorní potkan (*Rattus nor- vegicus*), kterého jsme krmili základní krmnou směsí s 6% přídavkem oleje řasy rodu *Schizochytrium* (DHA), resp. 6% přídavkem rybiho oleje (EPA). Po 14 týdnech výkrmu potkanů, jsme zjistili, že DHA prokazatelně snížila hmotnost potkanů ($P < 0,05$), ale v příjmu krmiva nebyl mezi jednotlivými skupinami pozorován průkazný rozdíl ($P > 0,05$). Obsah mastných kyselin ve viscerální tukové tkáni a játrech odpovídal obsahu mastných kyselin přijímaných potkany v krmivu. V játrech byl obsah mastných kyselin nižší než ve viscerální tukové tkáni. Dieta s obsahem DHA také průkazně snížila hladinu glukózy v plazmě ($P < 0,05$), což potvrzuje příznivý účinek na organizmus člověka, jelikož vysoké koncentrace glukózy mají za následek rozvoj diabetu mellitu. V případě EPA se takový vliv na snížení glukózy v plazmě neprokázal, což podporuje domněnku, že DHA je obecně účinnější než EPA.

Expese genu *PPAR γ* se u potkanů, krměných směsí s 6% obsahem oleje z řasy ro- du *Schizochytrium*, průkazně zvýšila ($P < 0,05$). Podařilo se mi tedy potvrdit hypotézu, že

suplementace DHA zvyšuje expresi tohoto genu. Naproti tomu u potkanů, krmených směsí s přídavkem rybího oleje, se exprese genů v podstatě nezvýšila ($P > 0,05$). Tento jev lze vysvětlit jedinečně nevýhodným poměrem EPA a DHA v rybím oleji, což je zajímavým podnětem pro další zkoumání. Z dostupné literatury jsme se dozvěděli, že zvýšení exprese genu *PPAR γ* je žádoucí a podporuje protizánětlivé procesy v organismu, zatímco inhibuje transkripční faktor NF- κ B, který má na svědomí zánětlivé procesy organismu, které vedou k rozvoji aterosklerózy. DHA tedy prokazatelně zvyšuje expresi *PPAR γ* , čímž splňuje předpoklad, že pomáhá předcházet rozvoji aterosklerózy. Co se účinnosti DHA vs. EPA týká, v případě genu *PPAR γ* jsme hypotézu potvrdili. U ostatních genů (*GPR120*, *AdipoR1* a *AdipoR2*) se vyšší účinnost DHA neprokázala, spíše naopak.

Závěrem našeho experimentu lze tedy konstatovat, že u genu *PPAR γ* jsme byli schopni hypotézu potvrdit. Co se ostatních genů týče, nelze hypotézu stoprocentně potvrdit, a proto by bylo vhodné se dané problematice dál věnovat a provádět další experimenty, např. zvýšit dávku EPA a DHA v krmivu nebo změnit poměr těchto mastných kyselin v krmivu.

PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

AFMAN L. A. A MÜLLER M., 2012: Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids, *Progress in Lipid Research*, 51: 63–70. ISSN 01637827

ANGHEL S. I. A WAHLI W., 2007: Fat poetry: a kingdom for *PPAR* γ , *Cell Research*, 17: 486–511. ISSN 1001-0602

BERÁNKOVÁ L., GRMELA R. KOPŘIVOVÁ J. SEBERA M., 2012: Oslabení kardiovaskulárního systému [online], Brno, Skripta, Masarykova univerzita, Fakulta sportovních studií. Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/ztv/pages/07-kardiovas-text.html>

BHASWANT M., POUDYALB H., BROWN L., 2015: Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids [online], *The Journal of Nutritional Biochemistry*. ISSN 09552863

Dostupné z <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286315000303>

BRAKENHIELM E., VEITONMAKI N., CAO R., KIHARA S., MATSUZAWA Y., ZHIVOTOVSKY B., FUNAHASHI T., CAO Y., 2004: Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8): 2476–2481. ISSN 0027-8424

BRESLOW J. L., 2006: n-3 fatty acids and cardiovascular disease, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6): 1477S–1482S. ISSN 1938-3207

BUSTIN S. A., 2000: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2): 169–193. ISSN 0952-5041

CALDER P. C., 2003: New evidence in support of the cardiovascular benefit of long-chain n-3 fatty acids, *Italian Heart Journal*, 4(7): 427–429. ISSN 1129-471X

CALDER P. C., 2006: Polyunsaturated fatty acids and inflammation, *Biochemical Society Transactions*, 33(2): 423–427. ISSN 09523278

CALDER P. C., 2012: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3): 645–662. ISSN 03065251

COUFAL P., 1996: Extrakce [online], Praha, Skripta, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>

DAS U., 2006: Essential fatty acids - A review, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7: 467–482. ISSN 13892010

DE BACKER G., 2003: European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice, *European Heart Journal*, 171(1): 145–155. ISSN 0195668x

DIEZ J. J., IGLESIAS P., 2003: The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease, *European Journal of Endocrinology*, 148(3): 293–300. ISSN 0804-4643

DRAPER E., REYNOLDS C. M., CANAVAN M., MILLS K. H., LOSCHER C. E., ROCHE H. M., 2011: Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF- κ B independent of *PPAR* γ , *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(8): 784–790. ISSN 09552863

- DUDOVÁ S., HÁJEK R., 2008: Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu, *Klinická onkologie*, 21: 220–222. ISSN 1802-5307
- ECKEL R. H., GRUNDY S. M., ZIMMET P. Z., 2005: The metabolic syndrome, *Lancet*, 365: 1415–1428. ISSN 0140-6736
- EL-BADRY A. M., GRAF R., CLAVIEN P. A., 2007: Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver?, *Journal of Hepatology*, 47: 718–725. ISSN 1600-0641
- FAHY E., SUBRAMANIAM S., MURPHY R. C., NISHIJIMA M., RAETZ C. R., SHIMIZU T., SPENER F., VAN MEER G., WAKELAM M. J., DENNIS E. A., 2009: Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *Journal of Lipid Research*, 50: S9–S14. ISSN 0022-2275
- FEDOROVA-DAHMS I., MARONE P. A., BAILEY-HALL E., RYAN A. S., 2011a: Safety evaluation of Algal Oil from Schizochytrium sp., *Food and Chemical Toxicology*, 49(1): 70–77. ISSN 02786915
- FEDOROVA-DAHMS I., MARONE P. A., BAUTER M., RYAN A. S., 2011b: Safety evaluation of DHA-rich Algal Oil from Schizochytrium sp., *Food and Chemical Toxicology*, 49(12): 3310–3318. ISSN 02786915
- FLOCK M. R., ROGERS C. J., PRABHU K. S., KRIS-ETHERTON P. M., 2013: Immunometabolic role of long-chain omega-3 fatty acids in obesity-induced inflammation, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 29(6): 431–445. ISSN 1520-7560
- GHIBAUDI L., COOK J., FARLEY C., VAN HECK M., HWA J. J., 2002: Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats, *Obesity Research*, 10(9): 956–963. ISSN 1550-8528
- GONZÁLEZ-PÉRIZ A., HORRILLO R., FERRÉ N., GRONERT K., DONG B., MORÁN-SALVADOR E., TITOS E., MARTÍNEZ-CLEMENTE M., LÓPEZ-PARRA M., ARROYO V., CLÀRIA J., 2009: Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins, *The FASEB Journal*, 23(6): 1946–1957. ISSN 1530-6860
- GROFOVÁ Z., 2007: *Nutriční podpora – Praktický rádce pro sestry*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Grada Publishing, 227 s. ISBN 978-80-247-1868-2
- HAJŠLOVÁ J., 2009: Lipidy [online], Praha, Výukový materiál, Institute of Chemical Technology. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~hajslovj/PDF_AP/AP_7.pdf
- HARRIS W. S., 2008: The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6): 1997S–2002S. ISSN 1938-3207
- HIRASAWA A., TSUMAYA K., AWAJI T., KATSUMA S., ADACHI T., YAMADA M., SUGIMOTO Y., MIYAZAKI S., TSUJIMOTO G., 2004: Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120, *Nature Medicine*, 11(1): 90–94. ISSN 1546-170X
- HODGSON J.M., MORI T.A., WAHLQVIST M.L., 2005: FATTY ACIDS | Omega-6 Polyunsaturated, In *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)*, 219–224. ISBN: 978-0-12-226694-2
- HOLEČEK V., 2006: *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Grada Publishing, 288 s. ISBN 80-2471-562-7

HYBLEROVÁ D., 2014: Vliv PUFA n-3 na expresi genů kódujících proteiny řídící homeostázu cholesterolu, Brno, Diplomová práce (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně), Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chemie a technologie potravin, vedoucí práce: Prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

CHEN F., CASTRANOVA V., SHI X., DEMERS L. M., 1999: New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases, *Clinical Chemistry*, 45(1): 7–17. ISSN 1530-8561

CHINETTI G., ZAWADSKI C., FRUCHART J. C., STAELS B., 2004: Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors *PPAR*alpha, *PPAR*gamma, and *LXR*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1): 151–158. ISSN 1090-2104

CHRISTIE W. W., 1989: *Gas Chromatography and Lipids: a practical guide*, 1. vydání, Ayr, Skotsko: Nakladatelství Oily, 320 s. ISBN 0-9514171-0-X

IM D. S., 2012: Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs, *Progress in Lipid Research*, 51(3): 232–237. ISSN 1873-2194

ITOH M., SUGANAMI T., SATOH N., TANIMOTO-KOYAMA K., YUAN X., TANAKA M., KAWANO H., YANO T., AOE S., TAKEYA M., SHIMATSU A., KUZUYA H., KAMEI Y., OGAWA Y., 2007: Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(9): 1918–1925. ISSN 1524-4636

KAPUT J., RODRIGUEZ R. L., 2004: Nutritional genomics: the next frontier in the post-genomic era, *Physiological Genomics*, 16(2): 166–177. ISSN 1531-2267

KHARROUBI I., RASSCHAERT J., EIZIRIK D. L., CNOP M., 2003: Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4): 1118–1122. ISSN 1090-2104

KERESTEŠ J., BÍREŠ J., EBRINGER L., ĎURAČKOVÁ Z., ČÁRSKY J., HORÁKOVÁ K., GREIFOVÁ M., SEKRETÁR S., STARUCH L., VALŠÍKOVÁ M., HRIČOVSKÝ I., GOLIAN J., LAGIN L., TRAKOVICKÁ A., CHLEBO P., ZÁLEŠÁKOVÁ J., FATRCOVÁ K., DANIŠKA J., MAČEK J., HARNADOVÁ Z., TOTH Z., HERIAN K., KOVÁČ M., DLOUHÝ P., MALA P., KOPÁČEK J., GAŽÁROVÁ M., KAJABA I., 2011: *Zdravie a výživa ľudí*. 1. vyd. Bratislava: Nika, 1040 s, ISBN: 978-80-88969-57-0

KIM H. Y., 2007: Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells, *Journal of Biological Chemistry*, 282(26): 18661–18665. ISSN 1083-351X

KIRK P., 1998: FATTY ACIDS | Monounsaturated, In *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)*, 198–205. ISBN: 978-0-12-226694-2

KLUSÁČKOVÁ Z. A SKOUMALOVÁ A., 2007: Úloha mastných kyselin v rozvoji Alzheimerovy choroby, *Klinická biochemie a metabolismus*, 20(41): 182–187. ISSN 1210-7921

KNOPP R. H., 1999: Drug treatment of lipid disorders, *New England Journal of Medicine*, 341: 498–511. ISSN 1533-4406

KOMPRDA T., 2012: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review, *Journal of Functional Foods*, 4(1): 25–38. ISSN 17564646

- KOPECKY J., ROSSMEISL M., FLACHS P., KUDA O., BRAUNER P., JILKOVA Z., STANKOVA B., TVRZICKA E., BRYHN M., 2009: n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function, *Proceedings of the Nutrition Society*, 68(4): 361–369. ISSN 0029-6651
- KUNOVÁ V., 2011: *Zdravá výživa*, 2. vydání, Praha: Nakladatelství Grada Publishing, 140 s. ISBN 978-80-247-3433-0
- LATRUFFE N., VAMECQ J., 1997: Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism, *Biochimie*, 79(2–3): 81–94. ISSN 1638-6183
- LEE C. H., OLSON P., EVANS R. M., 2003: Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors, *Endocrinology*, 144(6): 2201–2207. ISSN 1945-7170
- LEFILS J., GÉLOËN A., VIDAL H., LAGARDE M., BERNOUD-HUBAC N., 2010: Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice, *British Journal of Nutrition*, 104: 1304-1312. ISSN 1475-2662
- LEHRKE M., LAZAR M. A., 2005: The many faces of PPARgamma, *Cell*, 123(6): 993–999. ISSN 1097-4172
- LIBBY P., RIDKER P. M., MASERI A., 2002: Inflammation and Atherosclerosis, *Circulation Journal*, 105: 1135–1143. ISSN 1346-9843
- LIHN A. S., PEDERSEN S. B., RICHELSEN B., 2005: Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity, *Obesity Reviews*, 6(1): 13–21. ISSN 1467-789X
- LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D., 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4): 402–408. ISSN 1095-9130
- LOSCHER C. E., DRAPER E., LEAVY O., KELLEHER D., MILLS K. H., ROCHE H. M., 2005: Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction, *The Journal of Immunology*, 175(8): 4990–4998. ISSN 1550-6606
- LU J., BORTHWICK F., HASSANALI Z., WANG Y., MANGAT R., RUTH M., SHI D., JAESCHKE A., RUSSELL J. C., FIELD C. J., PROCTOR S. D., VINE D. F., 2011: Chronic dietary n-3 PUFA intervention improves dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA- cp rat model of the metabolic syndrome, *British Journal of Nutrition*, 105(11): 1572–1582
- MAEDA K., OKUBO K., SHIMOMURA I., FUNAHASHI T., MATSUZAWA Y., MATSUBARA K., 1996: cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(2): 286–289. ISSN 1090-2104
- MANDARD S., MÜLLER M., KERSTEN S., 2004: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(4): 393–416. ISSN 1420-9071
- MUKHERJEE P. K., MARCHESSELLI V. L., SERHAN C. N., BAZAN N. G., 2004: Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(22): 8491–8496. ISSN 1091-6490

- MURALI G., DESOUZA C. V., CLEVINGER M. E., RAMALINGAM M., SARASWATHI V., 2014: Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 90: 13-21. ISSN 1532-2823
- MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A., RODWELL V. W., 2002: *Harperova biochemie*, 4. vydání, Praha: Nakladatelství H&H, 871 s. ISBN 80-7319-013-3
- MUSA-VELOSO K., BINNS M. A., KOCENAS A., CHUNG C., RICE H., OPPEDAL-OLSEN H., LLOYD H., LEMKE S., 2011: Impact of low v. moderate intakes of long-chain n-3 fatty acids on risk of coronary heart disease, *British Journal of Nutrition*, 106(8): 1129–1141. ISSN 1475-2662
- NEWMAN DORLAND W. A., 2011: *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, 32. vydání, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2176 s. ISBN 978-1-4160-6257-8
- ODEGAARD J. I., RICARDO-GONZALEZ R. R., GOFORTH M. H., MOREL C. R., SUBRAMANIAN V., MUKUNDAN L., RED EAGLE A., VATS D., BROMBACHER F., FERRANTE A. W., CHAWLA A., 2007: Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance, *Nature*, 447(7148): 1116–1120. ISSN 00280836
- OSTER R. T., TISHINSKI J. M., YUAN Z., ROBINSON L. E., 2010: Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPAR γ mRNA, in 3T3-L1 adipocytes, *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 35: 783-789. ISSN 1715-5320
- OUCHI N., KIHARA S., FUNAHASHI T., NAKAMURA T., NISHIDA M., KUMADA M., OKAMOTO Y., OHASHI K., NAGARETANI H., KISHIDA K., NISHIZAWA H., MAEDA N., KOBAYASHI H., HIRAOKA H., MATSUZAWA Y., 2003: Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue, *Circulation Journal*, 107(5): 671–674. ISSN 1346-9843
- PERK J. G. (ed.), 2012: European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012), *European Heart Journal*, 33(13): 1635–1701. ISSN 0195-668x
- PFÄFFL M. W., 2001: A new mathematical model for relative quantification in realtime RTPCR, *Nucleic Acids Research*, 29: 2002–2007. ISSN 1362-4962
- POLÁK J., KLIMČÁKOVÁ E., KOVÁČIKOVÁ M., VÍTKOVÁ M., BAJZOVÁ M., HEJNOVÁ J., ŠTICH V., 2006: Endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inzulinové rezistence, *Interní medicína pro praxi*, 10: 443–446. ISSN 1212-7299
- RIŠKO P., KRAML P., POTOČKOVÁ J., STRÍŽOVÁ J., 2012: Antiinflatorní účinek statinů, *Interní medicína pro praxi*, 14(10): 362–364. ISSN 1212-7299
- RUSSO G. L., 2009: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention, *Biochemical Pharmacology*, 77(6): 937–946. ISSN 1873-2968
- SAKAI S., IZUKA N., FUJIWARA M., MIYOSHI M., AOYAMA M., MAESHIGE N., HAMADA Y., USAMI Y., USAMI M., 2013: Mild obesity reduces survival and adiponectin sensitivity in endotoxemic rats, *The Journal of Surgical Research*, 185(1): 353–363. ISSN 1095-8673

- SCHERER P. E., WILLIAMS S., FOGLIANO M., BALDINI G., LODISH H. F., 1995: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45): 26746–26749. ISSN 1083-351X
- SIMOPOULOS A. P., 2002: The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8): 365–379. ISSN 1950-6007
- SIMOPOULOS A. P., 2005: FATTY ACIDS | Omega-3 Polyunsaturated, In *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)*, 205–219. ISBN: 978-0-12-226694-2
- SIMOPOULOS A. P., 2006: The Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9): 502–507. ISSN 1950-6007
- SNUSTAD P. D., SIMMONS M. J., 2009: *Genetika*, 1. vydání, Brno: Masarykova univerzita, 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2
- STEPHENS A. S., STEPHENS S. R., MORRISON N. A., 2011: Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages, *BMC Research Notes*, 4: 410. ISSN 1756-0500
- STILWELL S. N., BIZOUARN T., JACKSON J. B., 1997: The reduction of acetylpyridine adenine dinucleotide by NADH: is it a significant reaction of proton-translocating transhydrogenase, or an artefact?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(1): 83–94. ISSN 0005-2728
- SU F., CHEN M., LIU CH. HUANG Y., LIN CH., SUNG F., SU CH., 2014: Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma: Genetic Polymorphisms Are Not Associated With Metabolic Syndrome in Taiwan, *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 6(6): 195–199. ISSN 18783317
- SVAČINA Š. A KOLEKTIV, 2008: *Klinická dietologie*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Grada Publishing, 381 s. ISBN 978-80-247-2256-6
- ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J., 2005: *Metody molekulární biologie*, Brno, Skripta, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
- ŠMEHILOVÁ M., 2012: *Principy a využití qPCR*, Olomouc, Studijní materiál, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
- VODRÁŽKA Z., 2002: *Biochemie*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Academia, 192 s. ISBN 80-200-0600-1
- VOET D., VOETOVÁ J. G., 1995: *Biochemie*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Victoria Publishing, 1362 s. ISBN 80-85605-44-9
- VON KNETHEN A., BRÜNE B., 2002: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by nitric oxide in monocytes/macrophages down-regulates p47phox and attenuates the respiratory burst, *The Journal of Immunology*, 169(5): 2619–2626. ISSN 1550-6606
- VON SCHACKY C., 2011: The Omega-3 Index as a risk factor for cardiovascular diseases, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 96(1–4): 94–98. ISSN 1098-8823
- VRABLÍK M., 2008: Umíme předcházet vzniku kardiovaskulárních onemocnění?, *Medicina pro praxi*, 5(3): 101–104. ISSN 1803-5310

WATKINS P. A., 2005: FATTY ACIDS | Metabolism, In *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)*, 186–198. ISBN: 978-0-12-226694-2

WINDER W. W., HARDIE D. G., 1999: AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 277(1): E1–E10. ISSN 0002-9513

YAMAUCHI T., KAMON J., ITO Y., TSUCHIDA A., YOKOMIZO T., KITA S., SUGIYAMA T., MIYAGISHI M., HARA K., TSUNODA M., MURAKAMI K., OHTEKI T., UCHIDA S., TAKEKAWA S., WAKI H., TSUNO N. H., SHIBATA Y., TERAUCHI Y., FROGUEL P., TOBE K., KOYASU S., TAIRA K., KITAMURA T., SHIMIZU T., NAGAI R., KADOWAKI T., 2003: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature*, 423(6941): 762–769. ISSN 00280836

YAMAZAKI R. K., BRITO G. A., COELHO I., PEQUITTO D. C., YAMAGUCHI A. A., BORGHETTI G., SCHIESEL D. L., KRYCZYK M., MACHADO J., ROCHA R. E., AIKAWA J., IAGHER F., NALIWAIKO K., TANHOFER R. A., NUNES E. A., FERNANDES L. C., 2011: Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats, *Lipids in Health and Disease*, 10: 66. ISSN 1476-511X

YOUNG OH D. Y., TALUKDAR S., BAE E. J., IMAMURA T., MORINAGA H., FAN W., LI P., LU W. J., WATKINS S. M., OLEFSKY J. M., 2010: GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects, *Cell*, 142(5): 687–698. ISSN 1097-4172

ZEMAN M., ŽÁK A., VECKA M., TVRZICKÁ E., PÍŠARÍKOVÁ A., STANKOVÁ B., 2006: N-3 fatty acid supplementation decreases plasma homocysteine in diabetic dyslipidemia treated with statin-fibrate combination, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(6): 379–384. ISSN 1873-4847

ŽÁK A. A KOLEKTIV, 2011: *Ateroskleróza*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Grada Publishing, 200 s. ISBN 978-80-247-3052-3

Internetové zdroje

ACTB [online], GENETICS HOME REFERENCE, 2013, posl. edit. 20. 4 2015, dostupné z <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ACTB>

Atherosclerosis [online], AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2014, posl. edit. 24. 4. 2014, dostupné z <http://www.heart.org/HEARTORG/>

DATABÁZE GENBANK [online], dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

The Basics: RT-PCR [online], autor Subbu Dharmaraj, LIFE TECHNOLOGIES, 2015, dostupné z <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/ambion-tech-support/rt-pcr-analysis/general-articles/rt--pcr-the-basics.html>

What Is Atherosclerosis? [online], NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE, 2014, posl. edit. 4. 7. 2014, dostupné z <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/atherosclerosis>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Syntéza PUFA n-3 a n-6.....	15
Obr. 2:	Strukturní vzorce DHA a EPA	16
Obr. 3:	Rozdíl mezi normální a tepnou postiženou aterosklerózou.....	21
Obr. 4:	Diferenciace makrofágů M2 podporovaná EPA a DHA.....	23
Obr. 5:	Působení rodiny PPAR v tkáních.....	24
Obr. 6:	Rozdílný efekt PPAR γ v organismu	25
Obr. 7:	Fylogenetický strom rodiny GPR	27
Obr. 8:	Vliv adiponektinu na různé tkáně	29
Obr. 9:	Amplifikace mRNA prostřednictvím reverzně-transkripční PCR.....	31
Obr. 10:	Průměrná konečná živá hmotnost potkanů.....	46
Obr. 11:	Průměrný denní přírůstek potkanů.....	47
Obr. 12:	Obsah kyseliny EPA a DHA v krmivu.....	50
Obr. 13:	Obsah kyseliny EPA a DHA ve viscerální tukové tkáni a játrech.....	52
Obr. 14:	Koncentrace glukózy v plazmě.....	53
Obr. 15:	Stabilita referenčních genů	54
Obr. 16:	Relativní gen. exprese PPAR γ	55
Obr. 17:	Relativní genová exprese <i>AdipoR1</i> , <i>AdipoR2</i> , <i>GPR120</i> , PPAR γ	57

SEZNAM TABULEK

Tab. 1:	Nejčastější nenasycené mastné kyseliny	14
Tab. 2:	Celkové složení krmných směsí	36
Tab. 3:	Množství živin v krmných směších	36
Tab. 4:	Složení elektroforetického 1 × FA pufru.....	41
Tab. 5:	Složení reakční směsi pro reverzní transkripci.....	42
Tab. 6:	Sekvence primerů.....	43
Tab. 7:	Reakční směs pro real-time PCR	43
Tab. 8:	Průměrná spotřeba krmiva.....	45
Tab. 9:	Průměrná živá hmotnost potkanů, přírůstek hmotnosti, hmotnost jater a viscerální tukové tkáně	46
Tab. 10:	Příjem EPA a DHA v posledním týdnu experiment. výkrmu	48
Tab. 11:	Obsah MK v krmivu.....	49
Tab. 12:	Obsah EPA a DHA v krmivu	49
Tab. 13:	Průměrný obsah MK ve viscerální tukové tkáni.....	51
Tab. 14:	Průměrný obsah MK v játrech.....	51
Tab. 15:	Relativní genová exprese <i>PPARγ</i>	54

SEZNAM ZKRATEK

AA	arachidonová kyselina
<i>ACTB</i>	gen pro aktin beta
<i>AdipoQ</i>	den pro adiponektin
AdipoR	receptor pro adiponektin
AF	Agronomická fakulta
Akt	proteinkináza B
ALA	α -linolenová kyselina
ALX	receptor pro lipoxin
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
C _T	cyklus, ve kterém fluorescence vzorku protne stanovený fluorescenční práh
DGLA	dihomo- γ -linolenová kyselina
DHA	dokosahexaenová kyselina
DPA	dokosapentaenová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidové trifosfáty
dsDNA	sdvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
E	efektivita polymerázové řetězové reakce
Ech	estery cholesterolu
EPA	eikosapentaenová kyselina
GLA	γ -linolenová
GPR	receptor spřažený s G-proteinem
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HNF	jaterní jaderný faktor
ChemR	receptor pro resolvin E1
ICAM	intracelulární adhezivní molekula
IL	interleukin
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LA	linolová kyselina
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
LXR	jaterní X receptor
MAPK	proteinkináza aktivovaná mitogeny

MENDELU	Mendelova univerzita v Brně
MK	mastné kyseliny
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
MYPO	kompletní krmná směs pro myši a potkany
NF	jaderný faktor
OX-LDL	oxidovaný lipoprotein s nízkou hustotou
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPAR	receptor aktivovaný proliferátory peroxizomu
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
Rnáza	ribonukleáza
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RXR	retinoidní X receptor
S6K	ribosomální proteinkináza
SPF	specifických patogenů prostý
SREBP	sterol regulační vazebný protein
STAT	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TF	transkripční faktor
TGF	transformující růstový faktor
TLR	receptory podobné Toll
TNF	tumor nekrotizující faktor
UNG	uracil N-glykozyláza
VCAM	vaskulární adhezivní molekula
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou
WHO	světová zdravotnická organizace