

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vliv přídatku řepkového šrotu na biochemické a hematologické ukazatele u laboratorního potkana

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Nikol Tůmová

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

2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv přídatku řepkového šrotu na biochemické a hematologické ukazatele u laboratorního potkana" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2014

Bc. Nikol Tůmová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat paní doc. Ing. Aleně Fučíkové, CSc. za její vedení práce, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Touto cestou bych také ráda poděkovala paní doc. Ing. Marii Prášilové, CSc. za konzultace při zpracování dat. Dále patří mé velké díky rodině a přátelům za pomoc, podporu, a toleranci.

Souhrn

Tématem mé diplomové práce je vliv přídatku řepkového šrotu na biochemické a hematologické ukazatele u laboratorního potkana. Cílem bylo zjistit, zda lze sójový extrahovaný šrot, který je do České republiky dovážen ze zahraničí, nahradit řepkovým extrahovaným šrotem produkovaným na území republiky a zda budou ovlivněny sledované ukazatele. Jako pokusné zvíře byl zvolen laboratorní potkan. Experiment probíhal ve Fyziologickém ústavu Akademie věd v ČR v Praze. Do pokusu bylo zařazeno 24 samců albinotického kmene Wistar narozených 1. června 2013. Zvířata byla rozdělena podle diet na 4 skupiny po šesti jedincích. Každá skupina byla krmena od 12. 7. 2013 do 27. 8. 2013 jinou dietou, jež se liší obsahem řepkového šrotu.

Po ukončení experimentu dne 27. 8. 2013 byla zvířata usnána. Pomocí injekční stříkačky jim byla odebrána krev ke stanovení hematologických a biochemických ukazatelů. Z hematologických parametrů byly zjišťovány tyto ukazatelé: počet erytrocytů (Er), hematokrit (Hk), hemoglobin (Hb) a střední objem erytrocytů (MCV). Z biochemických ukazatelů pomocí použití setů od firmy PLIVA- Lachema Diagnostika s.r.o. Brno byly vyšetřeny tyto ukazatelé: močovina, glukóza, cholesterol, triacylglycerol a celková bílkovina. Všechna zvířata byla zvážena a sledoval se vliv přídatku řepkového šrotu na váhu jedinců.

Výsledky všech měření byly statisticky vyhodnoceny. Pomocí programu Microsoft Excel se stanovovaly základní statistické popisné charakteristiky (průměr hodnot, směrodatná odchylka, rozptyl). Pro porovnání všech jedinců mezi sebou byl použit program Statistika, test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídatok řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Nulová hypotéza byla přijata pro všechny hematologické a biochemické ukazatele, kromě cholesterolu. Zde zamítáme nulovou hypotézu a tvrdíme, že vliv řepkového šrotu má vliv na hladinu cholesterolu v krvi. Prokázaná nižší hladina cholesterolu je však žádána a ŘEŠ lze využít jako adekvátní náhradu za SEŠ.

Klíčová slova: potkan, řepkový šrot, hematologie, biochemie

Summary

This master's thesis deals with the effect of adding the rapeseed meal on biochemical and haematological conditions in the rat. The objective was to determine whether the soybean extraction meal imported to the Czech Republic from abroad may be substituted by indigenous rapeseed extraction meal while the physiological values remain within normal limits. As experimental animal a laboratory rat was chosen. The experiment took place on the grounds of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic in Prague. The experiment included 24 male of Wistar albinotic strain born on June 1st 2013. The animals were divided according to their diets into 4 groups of 6 specimens. Each group has been fed by diet containing different amount of rapeseed meal since 12. 7. 2013 to 27. 8. 2013.

After finishing the experiment on August 27th 2013 animals were anesthetized. Using a syringe, blood sample and plasma was taken to specify haematological and biochemical markers. As to the haematological markers the following indicators were investigated: number of erythrocytes (Er), hematocrit (Hk), hemoglobin (Hb) and mean corpuscular volume (MCV). As to the biochemical markers, using sets from PLIVA-Lachema s.r.o. Brno company the following indicators were examined: urea, glucose, cholesterol, triacylglycerol, and total protein. All animals were weighed, the effect of adding the rapeseed meal on their weight was investigated.

The results of all measurements were statistically evaluated. By using Microsoft Excel, basic descriptive statistical characteristics (average values, standard deviation, and variance) were determined. For the mutual comparison of all specimens, ANOVA test in software "Statistika" was used. The hypothesis H_0 was established as follows: addition of rapeseed meal does not affect the value of the indicator. P-value must be greater than the significance level $\alpha = 0.05$.

The null hypothesis was accepted for all haematological and biochemical parameters, except for cholesterol. In case of cholesterol we reject the null hypothesis and claim that adding rapeseed meal has an effect on blood cholesterol levels. However, the lower cholesterol level proven is requested and rapeseed extraction meal can thus be used as an adequate substitute for soybean extraction meal.

Keywords: rat, rapeseed meal, red blood count, biochemicals

Obsah

1.	ÚVOD	1
2.	VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE.....	2
3.	LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	3
3.1.	Laboratorní potkan	3
3.1.1.	Historie a původ	3
3.1.2.	Nomenklatura potkanů	3
3.1.3.	Využití potkana.....	4
3.1.4.	Chování potkanů	4
3.2.	Hematologie	7
3.2.1.	Krev	7
3.2.2.	Krevní buňky.....	10
3.2.3.	Červené krvinky.....	10
3.2.4.	Hemoglobin	12
3.2.5.	Stanovení základních hodnot erytrocytů	19
3.3.	Řepka olejná	21
3.3.1.	Historie pěstování	21
3.3.2.	Řepkový extrahovaný šrot ŘEŠ.....	22
3.4.	Biochemické ukazatele	24
3.4.1.	Celková bílkovina.....	24
3.4.2.	Močovina (<i>Urea</i>)	25
3.4.3.	Glukóza.....	26
3.4.4.	Triacylglycerol	27
3.4.5.	Cholesterol	28
4.	Materiály a metodika.....	29
4.1.	Materiály.....	29
4.1.1.	Složení krmných směsí	29
4.1.2.	Ukončení experimentu.....	30
4.2.	Metodika.....	31
4.2.1.	Stanovení hematologických ukazatelů.....	31
4.2.2.	Stanovení biochemických ukazatelů	31
4.2.3.	Statistické zpracování získaných hodnot.....	32

5.	VÝSLEDKY	33
5.1.	Základní statistické hodnoty u biochem. ukazatelů	33
5.1.1.	Glukóza	33
5.1.2.	Močovina	34
5.1.3.	Celková bílkovina	35
5.1.4.	Triacylglycerol	36
5.1.5.	Cholesterol	37
5.2.	Hmotnost	39
5.1.	Základní statistické hodnoty u hematolog. ukazatelů	40
5.1.1.	Erytrocyty	40
5.1.2.	Hematokrit	41
5.1.3.	MCV	42
5.1.4.	Hemoglobin	43
6.	DISKUZE	44
7.	ZÁVĚR	49
8.	SEZNAM LITERATURY	50
9.	SEZNAM ZKRATEK	55
10.	PŘÍLOHY	56

1. ÚVOD

Pokusy na laboratorních potkanech se provádějí již od 19. století, kdy se zkoumali vlivy chemických látek na organismus zvířete. Laboratorní potkan je domestikovaný divoce žijící potkan, který je kosmopolitně rozšířen. Dnes je potkan nejčastěji používané laboratorní zvíře, díky snadné adaptabilitě na laboratorní podmínky, rychlému rozmnožování a nízkým nákladům na chov a potravu. Jelikož se studiem potkanů zabývalo a stále zabývá mnoho vědců, jsou známe veškeré biologické a fyziologické hodnoty. Díky znalosti těchto hodnot, lze jednoznačně určit rozdíly od normálu v rámci pokusů. Z těchto zmíněných důvodů, jsem využila laboratorního potkana kmene Wistar i ve své diplomové práci, zabývající se vlivem řepkového extrahovaného šrotu jako náhradu za sójový extrahovaný šrot.

Sójový extrahovaný šrot je významnou bílkovinnou součástí krmných směsí pro zvířata. Sója je z 90 % pěstována na území USA a Jižní Ameriky. Ekonomické náklady na dovoz a zkrmování sóji jsou vysoké a proto se hledají nové a cenově přijatelnější komponenty do krmných směsí.

V mé práci jsem svou pozornost věnovala řepkovému extrahovanému šrotu. Na rozdíl od sóji, je řepka pěstována převážně na území Evropy (15 mil tun), což sníží náklady spojené s dopravou. V České republice je řepka olejná nejpěstovanější olejninou na orné půdě. Výnosnost řepky je až 7,5 tun na hektar zemědělské půdy.

Složením se však oba druhy šrotu v některých živinových parametrech liší. Řepkový extrahovaný šrot má 2 krát vyšší obsah vlákniny než sójový a má i vyšší obsah energie. Z těchto důvodů nelze ŘEŠ a SEŠ ve výživě zaměnit, aniž by nebyl proveden pokus, který potvrdí či vyvrátí vliv na zdraví jedinců. Do pokusu bylo zařazeno 24 samců, rozdělených do 4 skupin, lišících se obsahem ŘEŠ. Rozdíly při krmení mezi ŘEŠ a SEŠ budu zjišťovat na vybraných hematologických a biochemických ukazatelích.

2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Cílem této práce je posouzení vlivu přídavku řepkového šrotu do diety laboratorního potkana na zdravotní stav prostřednictvím hodnot červeného krevního obrazu a vybraných biochemických ukazatelů. Experiment probíhal jako součást projektu Grantové agentury České republiky pod názvem „Transformace a speciace selenu v potravním řetězci: vliv diety obohacené selenem“ pod registračním číslem 13- 04580S a Fyziologickým ústavem Akademie věd v Praze.

Bude testována hypotéza, že náhrada sójového šrotu řepkovým šrotem neovlivní negativně sledované ukazatele. Předpokládáme, že diety nebudou mít žádný vliv na měřené parametry laboratorního potkana a řepkový extrahovaný šrot bude zařazen jako levnější alternativa za sójový extrahovaný šrot.

3.LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. Laboratorní potkan

3.1.1. Historie a původ

Laboratorní potkan je předkem divokého potkana (*Rattus norvegicus*). Potkan se řadí do čeledi myšovitých (*Muridae*) a řádu hlodavců (*Rodentia*). Původní vlastní divokého potkana je Indie, severní část Číny a jižní část Ruska (Sharp et al., 2013). Zásluhou lodní dopravy se počátkem v 18. století rozšířil z Asie do Evropy, kde se stal konkurentem pro krysu obecnou (*Rattus rattus*). Do konce 18. století se divoká forma potkana rozšířila i do Afriky a Ameriky. V současné době je potkan rozšířen po celém světě (Živná, 2001).

3.1.2. Nomenklatura potkanů

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Kmen: Strunatci (*Chordata*)

Podkmen: Obratlovci (*Vertebrata*)

Třída: Savci (*Mammalia*)

Řád: Hlodavci (*Rodentia*)

Podřád: *Myomorpha*

Čeleď: Myšovití (*Muridae*)

Rod: *Rattus*

Druh: Potkan (*Norvegicus*)

(Sharp et al., 2013)

Potkani se dělí do dvou skupin: inbrední zvířata označovaná jako rod (strain) a outbrední zvířata označována jako kmen (stock) (Sharp et al., 2013). Inbrední zvířata vznikají opakovaným křížením bratra se sestrou po 20 generací. Outbrední zvířata mají na rozdíl od inbredních, méně než 1 % příbuznosti v generaci (Živná, 2001).

3.1.3. Využití potkana

Od druhé poloviny 19. století se datují pokusy na zvířatech. Jako první pokusná zvířata se využívala ochočená hospodářská zvířata. První zprávy o použití potkana k pokusům pochází z roku 1856, kdy Waller a Philipeaux provedli adrenalektomii a sledovali její vliv na fyziologické parametry zvířete. Po roce 1880 byly zahájeny první chovné pokusy se snahou získat homogenní populaci. V roce 1900 je na Chicagské univerzitě zahájen chov albinotických potkanů, na který roku 1906 navazuje Wistar Institute. Tam byl odchován albinotický kmen Wistar, dnes jeden z nejpoužívanějších potkaních kmenů. Mezi další dnes hojně používané kmeny patří Long Evans (vytvořený dr. Longem a dr. Evansem roku 1915) a Sprague-Dawley (albinotický kmen z farmy Sprague-Dawley v Madisonu ve Wisconsinu, vytvořen 1924) (Živná, 2001).

Dnes patří laboratorní potkan mezi jedno z nejužívanějších laboratorních zvířat, hned po myši. Ve velké míře je využíván ve farmakologii, toxikologii, endokrinologii, embryologii, teratologii, experimentální chirurgii, onkologii, v experimentech v oblasti reprodukce a výživy. Potkana díky své odolnosti organismu nelze využít pro práci v mikrobiologii, imunologii apod. (Suckow et. al., 2006).

3.1.4. Chování potkanů

Domestikaci doprovází vždy řada změn, jak v oblasti morfologie, tak i chování. Domestikace potkana způsobila ztrátu plachosti, vymizení únikové vzdálenosti a snížení agresivity. Řada vlastností přetrvává nadále, jako je například tzv. komfortní chování. Komfortní chování představuje čištění srsti, protahování, panáčkování, značkování aj. Při znemožnění těchto vlastností bývají zvířata stresována (Sharp et al., 1998).

Jako výsledek domestikace je i snížení hmotnosti mozku, což vyplývá z pohodlnějšího života v lidské péči. Ostrost smyslů je snížena vymizením mladších oblastí mozku, a tím potkan není zatěžován množstvím vnějších podmětů. V důsledku této skutečnosti má potkan více času, který tráví hraním. Pokud je potkanům podáváno dostatek možností na hraní a zpestření času, jsou tato zvířata více adaptabilní a rezistentní vůči stresu. V praxi je tento požadavek velmi těžko splnitelný, neboť bývá v rozporu s přísnými hygienickými pravidly. Domestikace často mění i sociální uspořádání a narušuje sociální struktury u potkana (Živná, 2001).

V současnosti je uznáváno přes 50 kmenů laboratorních potkanů, v České republice jsou chovány a používány zejména tyto kmeny: Wistar, Lewis, Sprague-Dawley, Osborne Mendel, Fisher a Long-Evans.

Velikost těla se liší podle kmene. U potkana je značný sexuální dimorfismus ve velikosti a hmotnosti. Průměrná velikost dospělého laboratorního potkana je 20-25 cm od čenichu po kořen ocasu. Dospělý samec dosahuje hmotnosti 250 - 500 g, samice pouze 200 - 320 g (Knotková et al., 2000). Při odlišování pohlaví je rozhodující anogenitální vzdálenost (Živná, 2001)

Ocas je u kořene silný a zužuje se na konci do útlé špičky. Ocas je šupinkatý a dlouhý jako 85 % délky těla a hlavy (Suckow et. al., 2006). Ocas slouží jako termoregulační a rovnovážný orgánem (Živná, 2001). Páteř potkana je jako u všech savců složena ze 7 obratlů krčních, 13 hrudních, 6 bederních, 4 křížových a 27 - 30 ocasních obratlů (Suckow et. al., 2006). Žeber je 13 párů. Na hrudní končetině jsou 4 prsty, palec je zakrnělý. Na pánevní končetině je 5 prstů. Kost holenní a lýtková srůstají v jednu kost. Nozdry jsou uzavíratelné (adaptace na vlhké až vodní prostředí). Srst má podsadu a poměrně hrubé pesíky (Živná, 2001). Zubní vzorec pro hlodavce: jeden kvadrant zahrnuje 1 řezák (dorůstají neustále) a 3 moláry. Povrchová vrstva smaltu na řezácích obsahuje žluto-oranžový pigment na bázi železa (Sharp et al., 2013). Jazyk má 4 typy papil: vláknité, houbovitě, hrazené a lístkové (Suckow et. al., 2006). Srdce je tvořeno pravou a levou síní s pravým a levým srdečním ouškem a pravou a levou srdeční komorou. Potkan má 2 horní duté žíly, pravou a levou. Jícen je kryt rohovitou vrstvou a neumožňuje potkanům zvracet. Žaludek je vakovitého tvaru a má žláznatou a svalnatou část (Sharp et al., 2013). Sharp et al. (2013) udává, že tenké střevo má 3 oddíly: duodenum (10 cm dlouhé), jejunum (100 cm) a ileum (3 cm). Játra potkana váží 10 g na 250 g živé hmotnosti jedince a mají čtyři laloky (Suckow et. al., 2006).

Zvláštností potkana je, že nemá žlučový měchýř. Pravá plíce má 4 laloky a levá pouze 1. Thymus přetrvává (Živná, 2001). Potkaní děloha je stejně jako u myši samice dvojrohá, placenta diskoidální. Samice potkana mají 6 párů mléčných bradavek. Penis samce je vyztužen chrupavkou. Varlata sestupují mezi 30 až 40 dnem do skrotálního vaku. Potkan má 5 páru přídavných pohlavních žláz umístěných kolem močového měchýře (Suckow et. al., 2006). Stejně jako ostatní hlodavci nemají potkani potní žlázy (Sharp et al., 2013).

Tabulka č. 1 Hodnoty vybraných ukazatelů laboratorního potkana (Sharp et al., 2013, Knotková et al., 2000)

Počet chromozómů	42
Tělesná teplota	37,3 – 38,8 °C
Počet pulsů	200 – 600 / min
Počet dechů	66 – 210 / min
Krevní tlak systolický	116 – 130 mmHg (15,4 – 17,3 kPa)
Krevní tlak diastolický	181 – 110 mmHg (9,3 – 12,5kPa)
Pohlavní dospělost	4 – 8 týdnů
Použití k plemenitbě	8 – 10 týdnů
Využívání v plemenitbě	8 – 12 měsíců
Estrální cyklus	4 – 5 dní
Estrus	7 – 20 h
Doba gravidity	20 – 24 dní
Počet mláďat ve vrhu	6 – 12
Hmotnost mláďete při narození	3,5 – 7,0 g
Doba odstavu	21 – 28 dní
Hmotnost mláďat při odstavu	35 – 50 g
Počet vrhů za rok	7 – 9
Objem žaludku (dospělé zvíře)	11 – 16 ml
Produkce moči (dospělé zvíře)	11 – 15 ml / den
Produkce trusu (dospělé zvíře)	9 – 15 g / den

Potkani jsou zvířata se soumráchnou aktivitou. V chovu lze díky světelnému cyklu upravit aktivitu jedinců pro potřeby ošetřovatelů (Sharp et al., 2013). Žijí sociálně ve skupinách s vyvinutou samčí i samičí hierarchií, teritoriální hierarchie je potlačena. Teritorium je značkováno močí. U samců dochází k hierarchickým bojům, které však bývají mírnější než u myši a spíše ritualizované. V příznivých podmínkách se potkan může dožít věku více než 3 let (Živná, 2001).

3.2. Hematologie

Slovo hematologie pochází z řeckých slov *haimatos*= krev a *logos*= nauka. Hematologie (nauka o krvi) je věda zabývající se tvorbou, složením a funkcí krve a krvetvorných orgánů. Věnuje se příčinám, mechanismům vzniku a projevům patologických změn krve a následně jejich diagnostice a terapii (Doubek et al., 2003).

3.2.1. Krev

Krev je nepostradatelnou tělesnou tekutinou proudící v uzavřené cévní soustavě. Podílí se na vytváření vnitřního prostředí organismu. Pro správnou funkci krve je důležité, aby neustále cirkulovala tělem (Doubek et al., 2003). Tento pohyb je uskutečňován pomocí pulzace srdce a cév. Při stahu (systole) srdce je krev vytlačována do tepen o nižším tlaku a naopak při ochabnutí (diastole) se krev z žil vrací do srdce (Reece, 2011).

Hlavní funkce:

1) Transportní

Uskutečňuje přenos (transport) dýchacích plynů O_2 a CO_2 . Krev přenáší kyslík z plic do tkání a oxid uhličitý z tkání do plic (Rokyta et al., 2000). Rozvádí k buňkám živiny (glukózu, aminokyseliny, mastné kyseliny, atd.) vstřebané v zaživacím traktu a odvádí odpadní látky k exkrečním orgánům (ledviny, kůže a plíce) (Sova et al., 1990). Přenáší hormony (vznikající ve žlázách s vnitřní sekrecí), vitaminy a minerální látky (Pecka, 2002).

2) Regulační

Udržuje stálost vnitřního prostředí (homeostázu). Na homeostáze se podílí: stálá hodnota pH, stálý osmotický tlak, stálý poměr iontů a obsah vody (Sova et al., 1990). Krev se podílí na uchování množství hemostázou a hemokoagulací (Rokyta et al., 2000).

3) Obranná

Obranná funkce krve spočívá v nespecifických a specifických reakcích imunitního systému zprostředkovaných bílými krvinkami (Rokyta et al., 2000) Jako obranné složky v krvi jsou leukocyty, imunoglobuliny, cytosiny, proteiny akutní fáze, aj. Fagocytují mikroby, částice cizorodých bílkovin a škodliviny, které pronikly do organismu (Sova et al., 1990).

3.2.1.1. Složení krve

Krve obsahuje 80 % vody a 20 % sušiny. Skládá se z krevní plazmy (55 %) a buněčných součástí (45 %) (Pecka, 2002). Mezi buněčné součásti se řadí erytrocyty (červené krvinky), leukocyty (bílé krvinky) a trombocyty (krevní destičky). Krevní plazma je tekutá složka krve, mírně nažloutlé barvy, skládající se z 90 % vody a 10 % anorganických a organických látek v ní rozpuštěných (Rokyta et al., 2000).

3.2.1.2. Hematokrit

Hematokrit udává poměr objemu červených krvinek k celkovému objemu krve. Zjištění hematokritové hodnoty se provádí odstředěním sloupce nesrážlivé krve, který se rozdělí na jednotlivé složky podle specifické hmotnosti (Reece, 1998). Složky se mohou rozdělit na hematokritovou hodnotu (40 %) a podíl krevní plazmy (60 %). Na objemovém podílu krvinek se více než 99 % podílejí erytrocyty (Sova et al., 1990). Červené krvinky se nahromadí nejnižše a tvoří sloupec, který se označuje jako PCV (packed cell volume). Leukocyty a trombocyty leží v podobě, tenké, bělavé vrstvičky nad nimi. Tvoří vrstvu 0,5-1 %. Nejvýše je krevní plazma (Reece, 1998). Hematokrit u potkana má třikrát vyšší hodnotu než hemoglobin. Ringler et al (1979) udává hodnotu hematokritu pro potkana v rozmezí 0,39-0,54 l/l. Knotková et al (2000) udává užší rozmezí hodnot hematokritu a to v rozmezí 0,36-0,48 l/l

3.2.1.3. Objem krve

Objem krve tvoří přibližně 7-10 % hmotnosti dospělého zvířete (Reece, 1998). U laboratorního potkana se udává objem 5 až 7 ml na 100 g tělesné hmotnosti (Harkness et al., 1995). Celkový objem krve ovlivňuje věk zvířete (dospělé zvíře má nižší objem krve), fyzická námaha, výživa, březost, příjem tekutin, aj. U zvířete v klidu obíhá 50 % krve v krevním řečišti, 20% krve je obsaženo v játrech, 15 % ve slezině, 10 % v kůži a zbývajících 5 % v ostatních orgánech a tkáních. Objem krve nelze stanovit přímou metodou přesně, neboť prostým vykrvením se získá pouze kolem 50% krve. Zbylá polovina krve se nachází v kapilárách, žilných splavech, cévách a orgánech (Reece, 1998). Nepřímá metoda je přesnější, kde se používají speciální barviva pro značení červených krvinek (Sova et al., 1990).

3.2.1.4. Viskozita krve (vazkost)

Viskozita krve je odpor, kterým kapalina působí proti síle, která ji uvádí do pohybu. Vazkost je podmíněna přítomností krevních elementů, krevních bílkovin (důležitý je poměr albuminů a globulinů) a vody. Viskozita krve je 4-5 x vyšší než je viskozita vody, která je rovna nule (Sova et al., 1990). Fyziologické hodnoty se pohybují kolem hodnoty 1,5-2,5 mPa*s (Pecka, 2002). Viskozita je rozdílná v jednotlivých oddílech krevního řečiště. V aortě, která je široká, je viskozita menší, zvyšuje se v menších cévách. Viskozita stoupá při procesech, při kterých se zvyšuje počet krevních buněk, teplota nebo množství bílkovin v krevní plazmě (Pecka, 2002).

3.2.1.5. Barva krve

Červená barva krve je způsobena přítomností hemoglobinu, který je obsažen v červených krvinkách. Barva závisí na nasycení hemoglobinu kyslíkem. Barva může být od červené až po modravě fialovou. Při vysokém obsahu kyslíku je krev jasně červená (Reece, 1998).

3.2.1.6. pH krve

pH vyjadřuje záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v krvi. Tato koncentrace je v krvi relativně stálá. Krev savců má hodnotu pH kolísající v úzkém rozmezí 7,3-7,5 přičemž odklon o 0,3- 0,4 na obě strany může mít za následek smrt (Sova et al., 1990). Žilní krev je mírně kyselejší než krev tepenná. Jestliže má tepenná krev hodnotu pH = 7,4, pak žilní krev bude mít hodnotu asi 7,36 (Reece, 1998). Snížení pH se označuje jako acidóza a projevuje se až bezvědomím. Zvýšená hodnota pH nad 7,8 se nazývá alkalóza, vyznačující se tetanickými křečemi (Sova et al., 1990).

3.2.1.7. Onkotický tlak

Onkotický (koloidně osmotický) tlak je tvořen tlakem plazmatických bílkovin proti intersticiu. Hodnota tlaku činí 3,5 kPa (Doubek et al., 2003)

3.2.1.8. Osmotický tlak

Osmotický tlak vyjadřuje rozdíl mezi plazmou a vodou na ideálně polopropustné membráně (Doubek et al., 2003). Tlak krve je ovlivněn přítomností solí (např. NaCl) a organických látek (především bílkovin). Hodnota osmotického tlaku se vyjadřuje kryoskopicky, tj. pomocí teploty, při které roztok zamrzá (Sova et al., 1990). Osmotický tlak je závislý na osmolaritě. Dosahuje hodnoty asi 750 kPa (Doubek et al., 2003).

Roztoky, které mají shodný osmotický tlak s krevní plazmou, se nazývají *izotonické*. Roztok s nižším osmotickým tlakem než je krevní plazma se označuje jako *hypotonický* a *hypertonické* roztoky mají vyšší osmotický tlak než plazma (Sova et al., 1990).

3.2.2. Krevní buňky

V krvi se nacházejí tyto typy buněk: červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty) (Pecka, 2002).

3.2.3. Červené krvinky

Slovo červená krvinka neboli erytrocyt pochází z řeckého slova erytros= červený a kýtos = buňka (Pecka, 2002). Savčí červené krvinky jsou bikonkávní disky bez jader. Je to jediná buňka v těle neobsahující jádro (Rokyta et al., 2000). Jaderné červené krvinky mají ptáci, plazi a ryby. Červená krvinka savců je elastická, na povrchu je membrána tvořena fosfolipidy, sacharidy, skeletálními proteiny (zodpovědné za tvar), aktinem (umožňující deformaci), transmembránovými proteiny (tvořící transportní kanály) aj. (Doubek, 2003). Takto tvořená membrána je průchodná pro ionty Na^+ , K^+ a Cl^- přičemž uvnitř buňky se nalézá více draslíku než v plazmě (Sova et al., 1990). Sodíku a chloru je naopak více v plazmě než v nitru buňky. V centru buňky je uloženo krevní barvivo zvané hemoglobin, které tvoří 90 % veškeré sušiny krvinek. Zbývajících 10 % představují ostatní bílkoviny, lipidy, glukóza, minerální látky a některé enzymy (Sova et al., 1990).

3.2.3.1. Počet erytrocytů

Celkový počet erytrocytů lze stanovit přesným naředěním krve a jejich spočítáním v počítači komůrce pomocí elektronového mikroskopu. Po přepočtení faktorem ředění se zjistí celkový počet červených krvinek v 1 μl krve. Celkový počet lze zjistit i pomocí elektronických počítačů zařízení (celoskop) (Reece, 1998). Živná (2001) říká, že počet erytrocytů u laboratorního potkan je 9×10^{12} v litru krve. Knotková et al. (200) uvádí v literatuře pro počet erytrocytů rozmezí 5,5- 9,5 $10^{12}/\text{l}$. Změny v počtu červených krvinek jsou ve většině případů vyvolány zvýšením nebo snížením krvetvorby, náhradní krvetvorbou (játra, slezina), redistribucí (stres) a zvýšeným rozpadem nebo ztrátami erytrocytů (Doubek et al., 2003). *Oligocytemie*, neboli snížený počet erytrocytů, je vyvolána anémií nebo uremií. Opakem *oligocytemie* je *polycytemie*. Jde o zvýšení počtu erytrocytů. K *polycytemii* dochází při porušení kostní dřeně, hypoxických stavech, vysoké nadmořské výšce, stresu, aj (Doubek, 2007).

3.2.3.2. Tvar

Typický bikonkávní tvar erytrocytů savců poskytuje buňce o 30 % větší povrch než tvar koule (Sova et al., 1990). Výhodou je minimální vzdálenost pro difuzi dýchacích plynů a větší množství objemových změn vlivem osmotického tlaku bez narušení integrity membrány erytrocytů (Reece, 1998). Tento charakteristický tvar erytrocytů je udržován uspořádáním molekuly hemoglobinu a přítomností kontraktilních bílkovin v membráně červených krvinek. Červené krvinky jsou pružné. Při průchodu úzkými kapilárami dochází ke změně jejich tvaru, označované jako deformabilita červených krvinek (Sova et al., 1990).

3.2.3.3. Funkce

Hlavní funkcí červených krvinek je přenos kyslíku z plic do tkání, jelikož se váže na hemoglobin (Doubek et al., 2003). Mezi další vlastnosti lze zařadit spoluúčast na přenosu oxidu uhličitého z tkání do plic, transport živin a především aminokyselin. Hemoglobin z erytrocytů slouží jako pufř v krvi a tím se podílí na udržování pH. Erytrocyty mají schopnost pohltit na povrchu jedy a přepravit je do retikulohistiocytárního systému, kde dochází k detoxikaci pro tělo škodlivých látek (Sova et al., 1990).

3.2.4. Hemoglobin

Hemoglobin je červené krevní barvivo. Hemoglobin byl izolován jako čistá substance již v roce 1865 Wilhelmem Friedrichem Kuhnem (Pecka, 2002). Tvoří 80- 90 % sušiny červených krvinek a 90 % hmotnosti erytrocytu (Penka et al., 2011). Hemoglobin i hematokrit mají laboratorní potkani obecně vyšší hodnoty ve vzorcích krve odebraných z ocasní žíly ve srovnání s krví odebranou přímo ze srdce (Harkness et al., 1995).

Hemoglobin je složitá bílkovina obsahující globin a nespecifickou, barevnou skupinu hem. Hem je u všech obratlovců stejný, ale globin je druhově specifický. Molekula hemoglobinu se skládá ze čtyř skupin hemu spojených s jednou molekulou globinu. Každý hem obsahuje atom železa, na který se může volně a vratně navázat molekula kyslíku. Jedna molekula hemoglobinu tak obsahuje čtyři atomy železa a může nést čtyři molekuly kyslíku. Hladina hemoglobinu se může lišit mezi inbridními a outbridními potkany. Hladina se také liší věkem, pohlavím a zdravotním stavem jedince (Ringler et al., 1979). Vyšší hodnota bývá naměřena u samců (v průměru 14,6 g / 100 ml) než u samic (v průměru 13,8 g/ 100 ml) laboratorního potkana (Mitruka et al., 1981).

Funkce hemoglobinu

Základní funkcí hemoglobinu je přenos kyslíku z plic do tkání. Tento proces se nazývá oxygenace. V hemu je kyslík vázán pouze jednou vazbou. Díky této skutečnosti se kyslík lehce z vazby uvolní (Pecka, 2002).

Globin

Globinové řetězce jsou bílkoviny skládající se z aminokyselin. Tyto řetězce se liší počtem a pořadím jednotlivých aminokyselin (Pecka, 1998). Globin je syntetizován v ribozomech a jeho podíl činí v hemoglobinu 96 % (Doubek et al., 2003). Tvoří ho 2 páry řetězců. Největší zastoupení (97 %) představuje tetrametr HbA₁, 3 % připadají na HbA₂ a pouze nepatrné množství HbF (fetální hemoglobin) (Penka et al., 2011).

Hem

Základem hemu, jehož obsah jsou 4 % v hemoglobinu, je protoporfyrin (tetrapyrrol-čtveřice pyrrolových jader spojených methinovými můstky). Do protoporfyrinu se díky působení enzymu ferrochelatázy včlení železo čtyřmi vazbami a vzniká *hem* (Pecka, 2002). Centrální atom hemu je Fe^{2+} . Zdroj železa je plazmatický transferrin. Jestliže není železo včleněno do hemu z důvodu překročení vazebné kapacity transferrinu, je uchováván v buňkách ve formě ferritinu nebo hemosiderinu. Tyto látky jsou málo rozpustné agregáty ferritinu. (Doubek et al., 2003). Hemoglobin vyplňuje jednu třetinu červené krvinky. Zbylé dvě třetiny jsou vyplněné vodou a stromatem erytrocytu (Reece, 2011).

Na železo hemu, které zůstává dvojmocné, se v plicích váže kyslík a z hemoglobinu vzniká oxyhemoglobin. Krvinky savců přenášejí kyslík téměř bez ztráty, což je zapříčiněno nepřítomností jádra a mitochondrií. Energie na uskutečnění přenosu se získává anaerobní glykolýzou.

Karbaminohemoglobin

Po předání kyslíku tkáním se hemoglobin redukuje. Hemoglobin bez kyslíku se slučuje s oxidem uhličitým a vzniká karbaminohemoglobin. Oxid uhličitý se váže na aminoskupinu globinů. Takto je transportována asi čtvrtina celkového objemu oxidu uhličitého.

Karboxyhemoglobin

Při spojení hemoglobinu s oxidem uhelnatým vzniká karboxyhemoglobin (HbCO). Oxid uhelnatý se váže na stejné místo jako kyslík, což je na železo hemu (Reece, 2011). Jeho afinita je 200- 300 krát vyšší než afinita kyslíku (Pecka, 2002). Tímto spojením je znemožněno vázat kyslík. Zvýšené koncentrace oxidu uhelnatého 0,04 % ve vzduchu působí vážné otravy, koncentrace 1 % přivodí smrt zvířete (Sova et al., 1990).

Methemoglobin

Methemoglobin se skládá z hemoglobinu a trojmocným železem. Není schopen reverzibilně vázat kyslík. Vzniká při oxidaci dvojmocného železa na trojmocné, účinkem silných oxidantů (Reece, 2011). Methemoglobin se tvoří v těle neustále v malém množství, pod 1 % Hb. Zvýšené množství methemoglobinu vyvolává v organismu tzv. methemoglobinémii (Rokyta et al., 2000). Dochází k ní při zvýšeném množství dusičnanů nebo dusitanů ve vodě. Ty se v trávicím ústrojí redukují bakteriální činností na dusitany, které jsou pro zvíře jedovaté. Methemoglobin se také tvoří při zvýšeném množství peroxidů. Tvorbu peroxidů vyvolávají některé léky a chemikálie (Pecka, 2002).

Tvorba červených krvinek

Tvorba červených krvinek se nazývá erythropoéza (Reece, 1998). Jde o proces tvorby a vývoje červených krvinek v červené (erytroidní) vývojové řadě (Pecka, 2002). V časném embryonálním vývoji se tvoří erytrocyty v mezodermu žloutkového váčku a krvetvorba probíhá uvnitř cév (Sova et al., 1990). V první třetině gravidity začíná krvetvorba ve slezině a v játrech (Reece, 2011). Od poloviny gravidity až do narození (prenatální období) se erytrocyty tvoří v játrech, slezině a převážně v kostní dřeni (Sova et al., 1990). V době od porodu až do dospělosti (postnatální období) se červené krvinky tvoří výhradně v červené kostní dřeni především dřeh obratlů, žeber a plochých kostí. Při erythropoéze se tvoří z nediferencovaných kmenových buněk nejdříve prekurzory obsahující jádro. S postupem času lze sledovat zmenšování velikosti krvinky, vymizení jadérka a rozpad jádra (Sova et al., 1990). Vypuzením nebo fragmentací jádra vznikají retikulocyty, které vyzárají na erytrocyty (Pecka, 2002).

Fáze vývoje červené krvinky

1. Pronormoblast (proerytroblast)

Buňka má zakulacený tvar a průměr 12-19 μm . Jádro je kulaté o průměru 13 μm . Bývá uloženo centricky a zabírá převážnou část buňky. V buňce se také nacházejí 2 až 4 jadérka.

2. Bazofilní normoblast (erytroblast)

Velikost buňky dosahuje rozměru 8 – 16 μm . Jádro je uloženo ve středu erytroblastu, je kulaté o průměru 8 μm (Pecka, 2002).

3. Polychromatofilní normoblast

Tvar buňky je kulatý a velikost okolo 8- 12 μm . Jádro je velmi sytě zbarvené. Jeho průměr je 6- 7 μm (Pecka, 2002). Zaujímají 1- 18 % červených krvinek potkana (Doubek et al., 2003)

4. Ortochormní normoblast

Průměr buňky je 8- 10 μm , což odpovídá již velikosti zralé červené krvinky. Jádro je malé a průměru 5 μm (Pecka, 2002).

5. Retikulocyty

Retikulocyt představuje přechod mezi jaderným erytroblastem a zralým erytrocytem. Retikulocyt je mladý erytrocyt o velikosti 7- 9 μm obsahující v cytoplazmě po vypuzení jádra zbytky původní struktury některých organel, jako jsou například ribozomy a endoplazmatická retikula. Tyto organely obsahují ribozomální RNA a mRNA nazývané se substantia granulofilamentosa. K zviditelnění těchto struktur se používá tzv. vitální barvení, které zvýrazní vnitřní struktury obsahující RNA. Podle množství zrn a sítě lze rozeznat několik stádií ve zralosti retikulocytů. Méně zralé retikulocyty vytváří klubko nebo síť. Zralejší retikulocyty obsahují neúplnou síť nebo zrna (Pecka, 2002). Počet retikulocytů je u mladých potkanů až 20 % a u dospělých jedinců pouze 2-5 % (Doubek et al., 2003).

6. Erytrocyty

Erytrocyt je již dospělá červená krvinka. Nazývá se též normocyt. Je to bezjaderná krvinka o průměru 6,7- 7,7 μm (Pecka, 2002). Erytrocyty potkana mají v průměru 6,2 μm (Schermen, 1967). Typické pro potkaní krvinku je významná anizocytéza, což znamená, že všechny krvinky nemají stejnou velikost. Některé krvinky jsou menší (mikrocyty) a některé větší (makrocyty) (Doubek et al., 2003).

Průběh erythropoézy

Erythropoéza začíná multipotentní kmenovou buňkou (CFU-blast= colony forming unit-blast), což je výchozí buňka pro krevní elementy, se schopností sebeobnovy (vznik 2 identických buněk) (Doubek et al., 2003).

Na kmenovou buňku navazují specifické progenitorové buňky CFU-GEMM a z nich vycházející E/Meg progenitor. Do této chvíle vycházejí erytropoéza a megakaryopoéza ze společné linie, ale nadále již pokračují samostatně. Erytropoéza postupuje přes erytroidní prekurzory BFU-E (burst forming unit-erythroid) a CFU-E (colony forming unit-erythroid), jež jsou závislé na přítomnosti erythropoetinu (EPO) a dávají vznik již diferencovatelným proerytroblastům (Penka et al., 2011). Ve vývojové řadě po proerytroblastech následují bazofilní erytroblasty, polychromatofilní erytroblasty a ortochromní erytroblast, posledně jmenovaný již není schopný dělení (Penka et al., 2011). V tomto stádiu dochází k vypuzení jádra, které je fagocytováno ostrůvkovými makrofágy po změně metabolické aktivity (Doubek et al., 2003). Poté následuje stupeň proerytrocyt, zvaný též jako retikulocyt, který je již bezjaderný. Retikulocyty mají proteosyntetickou aktivitu, obsahují polynomy, a dochází v nich k syntéze hemoglobinu. Po 48 hodinách dochází k vyžráním retikulocytů až na konečné stadium červených krvinek (Pecka, 2002)

Regulace erytropoézy

Erytropoéza je regulována hormonem erythropoetinem, což je po chemické stránce glykoprotein (Pecka, 2002). Hormon se v první řadě tvoří v juxtaglomerulárním aparátu ledvin a částečně i v játrech. Působí na úrovni nediferencovaných kmenových buněk a zvyšuje jejich diferenciaci na zralejší formy červené vývojové řady a dále vyvolává uvolnění retikulocytů z krve tvorných orgánů (Sova et al., 1990). Signálem pro jeho zvýšenou tvorbu je pokles parciálního tlaku kyslíku v krvi protékající těmito orgány (Rokyta et al., 2000). Erythropoetin stimuluje kostní dřeň k zahájení tvorby nových červených krvinek (Reece, 1998). Takto nově vzniklé erytrocyty se v krvi objevují až po 5 dnech od zahájení jejich tvorby.

Na regulaci erytropoézy mají také vliv další hormony. Krvetvorba je podporována růstovým hormonem, kortikoidy, samčími pohlavními hormony a hormony štítné žlázy. Naopak na snížení krvetvorby se podílejí samičími pohlavními hormony (Pecka, 2002).

Při procesu erytropoézy se uplatňují i některé vitaminy a minerální látky (Pecka, 2002). Na dozrávání červených krvinek se uplatňuje především vitamin B₁₂, kyselina listová, kyselina nikotinová, vitaminy B₂, B₆ kobalt. Na erytropoéze se podílejí i játra, která slouží jako zásobárna vitaminu B₁₂, kyseliny listové a železa.

Dalším orgánem sloužícím pro správnou erytropoézu je žaludek produkující kyselinu chlorovodíkovou, která je nezbytná pro uvolnění železa z komplexu organických molekul. V žaludku se secernuje i vnitřní faktor, který je nutný pro vstřebávání vitamínu B₁₂ (Sova et al., 1990).

Zánik červených krvinek

Červená krvinka žije od 60 do 140 dní podle druhu zvířete. U drobných savců jako je potkan nebo myš žijí erytrocyty kratší dobu (Doubek et al., 2003). Harkness et al. (1995) říká, že životnost červené krvinky u potkana je 45 až 68 dní. Tím jak erytrocyt stárne, prodělává metabolické změny. Membrána se stává tužší a zároveň křehčí, mění tvar a stává se kulatější. Současně dochází k hemolýze (rozpadu erytrocytů) asi 10 % starých erytrocytů v cévách. Zbylé erytrocyty jsou selektivně odstraněny z krevního oběhu specializovanými buňkami MPS (mononuclear phagocytic system). K rozpadu červených krvinek dochází buď uvnitř cévního systému, nebo mimo cévní systém (Doubek et al., 2003).

1) Rozpad uvnitř cévního systému- nitrocévní rozpad

Rozpadem erytrocytů se uvolní hemoglobin. Při tomto typu rozpadu se hemoglobin dělí na α - β - dimery a váže se na plazmatický glykoprotein haptoglobin. Vznikne pevný komplex hemoglobin- haptoglobin (Hb-Hp), který nemůže být vyloučen ledvinami (Doubek et al., 2003). Tento komplex je z krevního oběhu odstraňován pomocí MFS a to především v játrech (Pecka, 2002). Při extrémním rozpadu červených krvinek může nastat nedostatek haptoglobinu. Takto volný hemoglobin se vylučuje ledvinami nebo dochází k oxidaci dimérů za vzniku methemoglobinu, který obsahuje Fe³⁺ (Doubek et al., 2003). Z molekuly methemoglobinu jsou uvolněny globinové řetězce. Zbývající hematin je navázán na další transportní bílkovinu hemopexin. Jestliže je kapacita hemopexinu přesycená, je hematin přechodně vázán na albumin. Dochází ke vzniku methemoglobinového komplexu zadržovaného v ledvinách. Hemopexin v játrech uvolňuje hematin a volný nosič se vrací zpět do krevního oběhu a vyvazuje hematin z methemoglobinového komplexu (Pecka, 2002).

Výsledkem nitrocévního rozpadu červených krvinek je štěpení hemoglobinu na hem a globin. Nastává uvolnění železa z hemu a zbytek je metabolizován v tkáňových makrofázích na bilirubin (Pecka, 2002).

2) Rozpad mimo cévní systém- rozpad v tkáňových makrofázích

Proces rozpadu je provázen odbouráváním erytrocytů v MFS, a to ve slezině, játrech a kostní dřeni. Nedochozí ke vzniku dimerů ani k vazbě hemoglobinu na haptoglobin (Pecka, 2002). Celý mechanismus odbourávání uvolněného hemoglobinu vede přes několik meziproduktů. Hem se rozpadem a otevřením portifirinového kruhu oxidací metinohemových skupin mění na verdhemoglobin. Po odštěpení železa a bílkoviny globinu vzniká z verdhemoglobinu *biliverdin* (zelené barvivo) (Pecka, 2002). Biliverdin je dále redukován na bilirubin (žluté barvivo) (Reece, 1998). Volný bilirubin, který je nerozpustný ve vodě, je uvolňován do plazmy, kde se váže na bílkovinu albumin a je transportován do jater. Zde se bilirubin spojí s kyselinou glukuronidovou a vytváří bilirubinglukuronid, který je již rozpustný ve vodě. Následuje uvolnění do žluče a tím i přechod do střeva. V tlustém střevě je díky přítomným bakteriím bilirubinglukuronid redukován na urobilinogen a sterkobilinogen (obě látky bezbarvé) (Pecka, 2002). Oba tyto produkty jsou v oxidované formě vyloučeny jako sterkobilin, což je hnědý pigment dodávající výkalům typickou barvu. Část urobilinogenu se ze střev vstřebává do krve a vrací se opět do jater. Další část se nedostává do jater, ale putuje do velkého krevního oběhu a je vyloučena močí, kde představuje její typickou barevnou součásti (Reece, 1998).

3.2.5. Stanovení základních hodnot erytrocytů

Mezi základní hodnoty červených krvinek jsou řazeny: střední objem erytrocytu, hemoglobin erytrocytu a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech. Pro výpočet ukazatelů se používají hodnoty hemoglobinu, hematokritu a počtu červených krvinek (Doubek et al., 2003)

Střední objem erytrocytu

Střední objem erytrocytu (MCV= *mean corpuscular / cell volume*) se vypočítá z hodnoty hematokritu a počtu erytrocytů podle vzorce

$$\text{MCV} = \frac{\text{Ht (l/l)} * 10^{15}}{\text{Ery/l}}$$

Jednotkou středního objemu erytrocytu (MCV) je femto= fl= 10^{-15} .

Hemoglobin erytrocytu

Hemoglobin erytrocytů (MCH= *mean corpuscular/ cell hemoglobin*) udává množství hemoglobinu v 1 erytrocytu (Pecka, 2002). MCH se vypočítá z koncentrace hemoglobinu v krvi a počtu erytrocytů podle vzorce (Doubek et al., 2003):

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hb(g/l)} * 10^{12}}{\text{Ery/l}}$$

Jednotkou hemoglobinu erytrocytů (MCH) je piko= p = 10^{-12} .

Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu

Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC= *mean corpuscular/ cell hemoglobin concentrartion*) udává množství hemoglobinu v erytrocytární masě (Pecka, 2002). MCHC se vypočítá z koncentrace hemoglobinu a hodnoty hematokritu podle vzorce:

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

Jednotkou střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC) je g/l erytrocytární masy (Doubek et al., 2003).

Tabulka č. 2 Přehled vybraných hodnot hematologických ukazatelů (Sharp et al., 2013; Živná, 2001)

Ukazatel	Hodnota v jednotkách
Počet erytrocytů	9 x 10 ¹² /l
Hematokrit	0,40 (0,35 - 0,45)
Hemoglobin	150 g/l (110 - 190 g/l)
Velikost erytrocytů	6,5 μm
Průměrný objem erytrocytu (MCV)	46 - 65 fl
Průměrná barevná koncentrace Hb (MCHC)	310 - 400 g/l
Průměrný obsah hemoglobinu (MCH)	18 - 23 pg
Retikulocyty	0 - 25 %

3.3. Řepka olejná

Řepka olejná je jednoletá olejnina pěstující se v oblasti mírného pásu (Zeman, 1990). Pro olejniny je typické hromadění tuku v plodech nebo semenech rostliny ve velkém množství. Pod pojmem řepka se zahrnuje řepka a řepice. Patří mezi dvouděložné rostliny do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) (Suchý et al., 2007). Druh vznikl po křížení brukve zelné (*B. oleracea*) s 18 chromozomy a brukve řepice (*B. campestris*, *B. rapa*) s 20 chromozomy. Řepka olejka se pěstuje ve v podruzích *B. napus* L. subsp. *napus* – brukev řepka olejka a *B. napus* L. subsp. *Rapifera* Metzger – brukev řepka tuřín – kolník (Baranyk et al., 2007). Podle doby pěstování se rozlišují formy jarní a ozimá.

Řepka olejná- ozimá

V České republice je nejdůležitější pěstovanou olejninou. Ve střední Evropě převládá v pěstování řepka ozimá díky vyšší výnosnosti (Baranyk et al., 2007). Vegetační doba řepky v České republice je 300- 340 dnů. Rostlina kvete od konce dubna až do začátku května (Zeman, 1990). Semeno začíná klíčit, pokud teplota přesáhne +1 °C. Rostlina je díky síle kořenového krčku schopná odolávat i holomrazům až do teploty – 20 °C (Vašák et al., 2000)

Řepka olejná- jarní

V dnešní době se řepka jarní pěstuje na značně menší ploše především pro nižší a kolísavé výnosy oproti řepce ozimé (Baranyk et al., 2007). Oproti řepce ozimé je rostlina citlivá na nevlídné počasí. Řepka jarní kvete od konce května a začátkem června (Zeman, 1990).

3.3.1. Historie pěstování

K velkému rozmachu v pěstování dochází po roce 1960, kde je vyšlechtěn nový druh „0“. V České republice se druh „0“ začíná pěstovat od roku 1974 (Vašák et al., 2000). Tento druh obsahuje oproti dříve pěstovaným druhům méně kyseliny erukové, která způsobuje zhoršení chuti, zdravotní problémy jako například poškození myokardu a poruchy růstu. V České republice se po roce 1984 začala pěstovat odrůda „00“ s minimálním obsahem kyseliny erukové (maximum 2 %) (Zeman, 1990). V dnešní době se šlechtí odrůda „000“ s nižším obsahem vlákniny a zvýšeným obsahem tuku a bílkovin (Baranyk et al., 2007).

Řepka je v celosvětovém měřítku čtvrtou nejpěstovanější plodinou. Řepce se při pěstování dobře daří od nížin až do nadmořské výšky 700 m a při průměrné roční teplotě 6,5-8,5 °C. Hlavní oblast pro pěstování v České republice je soustředěna do bramborářské a řepařské oblasti. Řepka olejná dosahuje od 100 až do 150 cm. Květenství vytváří hrozny a květ je tvořen 4 žlutými korunními plátky (Baranyk et al., 2007). Sklizeň bývá v druhé polovině července (Vašák et al., 2000). Po sklizni následuje přečištění a úprava vlhkosti semene. Osemení má více vrstev a představuje 12- 16 % hmotnosti semene. Obsahuje 9- 16 % oleje, 15- 18 % bílkovin a 31- 34 % vlákniny. Zbylá semena, dělohy a embrya obsahují 47 % oleje, 28- 30 % bílkovin a 3 % vlákniny.

Řepka obsahuje řadu složek, které snižují energetické a dietetické vlastnosti. Nejvýznamnější jsou antinutriční látky, jež zastupují taniny (1,5 %), glukosinoláty (0,9 %), sinapiny (1,5 %), fytin a kyselinu erukovou (Baranyk et al., 2007). Kyselina eruková působí škodlivě na činnost srdečního svalu, žláz s vnitřní sekrecí, zejména pohlavních orgánů, zhoršuje plodnost a poškozuje cévy. Snižuje příjem potravy, růst a využití energie (Suchý et al., 2007).

3.3.2. Řepkový extrahovaný šrot ŘEŠ

Při získávání oleje z řepkového semene se používají metody lisování nebo extrakce (Zeman, 1990). Řepkový extrahovaný šrot se získává při extrakci tuku ze semen. Jedná se o bílkovinné krmivo. V současné době řepkový extrahovaný šrot nahrazuje z části šrot sójový, který je do České republiky dovážen (Baranyk et al., 2007). Řepkový šrot obsahuje 26 % sacharidů, převažující jsou polysacharidy.

Tabulka č. 3 Obsah živin (g/ kg sušiny) neporušeného a loupaného řepkového semene v řepkovém extrahovaném šrotu (Suchý et al., 2007).

	ŘEŠ neporušené	ŘEŠ loupaný
Organická hmota	923	918
Dusíkaté látky	396	424
Tuk	21	21
Vláknina	117	72
NDF	286	193
ADF	209	135
Lignin	88	44
Cukry	105	120

Tabulka č. 4 Chemické srovnání (g/kg sušiny) řepkového extrahovaného šrotu (ŘEŠ) a sójového extrahovaného šrotu (Suchý et al., 2007)

	ŘEŠ	SEŠ
Dusíkaté látky	402	493
Tuk	54	27
Vláknina	111	70
NDF	295	125
ADF	206	91
Lignin	53	14
Cukry	107	100

ŘEŠ má nižší obsah dusíkatých látek a značně vyšší obsah vlákniny v porovnání se sójovým extrahovaným šrotem. Koeficient stravitelnosti proteinu a dostupnost aminokyselin jsou nižší v řepkovém šrotu než ve šrotu sójovém. Obsah energie hovoří pro použití ŘEŠ, díky vyššímu obsahu tuku ve šrotu (Suchý et al., 2007). Zeman (1990) doporučil používání ŘEŠ pouze jako doplněk, nikoli jako náhradu za sójový extrahovaný šrot díky nižší hodnotě energie a dusíkatých látek.

3.4. Biochemické ukazatele

3.4.1. Celková bílkovina

Bílkovina se skládá z L- α - aminokyselin, které jsou navzájem spojené peptidovými vazbami (CO-NH) (Trojan et al., 2003). Molekuly bílkovin se od sebe liší jak složením aminokyselin, tak i molekulovou hmotností. Aminokyselinový řetězec se dělí na peptidy, polypeptidy a proteiny. Podle složení bílkovinných molekul rozlišujeme jednoduché nebo složené bílkoviny, které obsahují vedle bílkovinné složky i nebílkovinou. Mezi jednoduché bílkoviny se řadí skleroproteiny (vláknitá struktura) a sferoproteiny (lobulární struktura). Složené bílkoviny dělíme na fosfoproteiny, glykoproteiny, lipoproteiny, nukleoproteiny, chromoproteiny a metaloproteiny. Hlavní funkcí bílkovin je stavební funkce. Kolagen a elastin vytvářejí pojivovou a kostní tkáň. Další neméně důležitou funkcí je transport oxidu uhličitého a kyslíku díky bílkovinnému hemoglobinu, železa pomocí transferrinu a lipidů využitím lipoproteinů. Mezi další úkoly v organismu, za které jsou zodpovědné enzymy a hormony na bázi peptidů a proteinů je katalytická a regulační funkce. V neposlední řadě mají bílkoviny obrannou a ochranou funkci při tvorbě protilátek (imunoglobulinů)(Matouš et al., 2010).

V krevní plazmě je 7-8 % bílkovin. U laboratorního potkana je biologickém séru 45-84 g/l celkové bílkoviny (Živná, 2001), přesněji 56- 76 g/l (Knotková et al., 2000). Podle Sovy et al (1990) se bílkoviny krevní plazmy dělí na albuminy, globuliny a fibrinogen.

Albuminy mají nejnižší molekulovou hmotnost, ale jejich počet je nejvyšší. Představují 80 % všech plazmatických bílkovin (Reece, 1998). Podílejí se na tvorbě onkotického tlaku a udržení stálé hladiny plazmatické vody. Při sníženém počtu bílkovin ve výživě klesá onkotické tlak, voda uniká z cév a tím dochází ke vzniku otoků ve tkáních. Albuminy také slouží jako přenašeči například hormonů (Rokyta et al., 2000).

Globuliny se dělí na α , β a γ (Reece, 1998). Jednotlivé frakce se dále dělí na α_1 a α_2 a β_1 a β_2 . Molekulární hmotnost je dvojnásobně větší než hmotnost albuminů. Globuliny vážou některé hormony a enzymy. Nejvýznamnější vlastností α_1 je transport tuků a α_2 vazba s mědí a volným hemoglobinem. β globuliny se účastní transportu železa a tuků v organismu (Rokyta et al., 2000). Nejdůležitější pro obranu organismu jsou považovány γ globuliny (imunoglobuliny) (Reece, 1998).

Fibrinogen je největší molekula z plazmatických bílkovin. Jeho nepostradatelnou funkcí je účast na srážení krve (Rokyta et al., 2000).

Plazmatické bílkoviny mají několik funkcí. Udržují objem krevní plazmy díky přítomnosti bílkovin, které působí na kapilární membránu, tím vytváří onkotický tlak, který nasává vodu z intersticia do kapilár. Další funkcí se stálost izohydrie vázáním vodíkových iontů. Po uvolnění iontu z bílkovin se stávají proteinátovými anionty. Jakmile poklesne pH, anionty se spojují s H^+ a uplatňují se jako nárazníkový systém. Mezi další funkce plazmatických bílkovin lze jmenovat například nutriční význam, význam pro suspenzní stabilitu krve, proteolytický systém, plazmatické inhibitory proteáz a obrana organismu proti infekcím (Trojan et al., 2003).

3.4.2. Močovina (*Urea*)

Po chemické stránce je močovina diamid kyseliny uhličité (H_2NCONH_2). Představuje konečný produkt metabolismu bílkovin (Matouš et al., 2010). Živná (2001) ve své publikaci uvádí, že hodnota dusíku močoviny je pro laboratorního potkana v rozmezí 1,83 - 3,83 mmol/l. Knotková et al. (2000) ve své publikaci stanovila pro potkany vyšší rozmezí hodnot od 0,8 do 3,5 mmol/l.

Deaminační reakce uvolňují z nadbytečných aminokyselin amoniak, který je pro organismu toxický. Močovina vzniká v močovinovém (ornitinovém neboli malém Krebsově) cyklu z amoniaku. Močovinový cyklus je lokalizován v cytoplazmě a v mitochondriích jaterních buněk. Po průběhu cyklu je močovina krví odváděna do ledvin, kde přispívá k vysoké koncentraci rozpuštěných látek recirkulací mezi sběracími kanálky a Henlcovou kličkou. Zde je močovina zadržena pro neprostupnost membrány kličky a podle množství antidiuretického hormonu putuje do sběrných kanálků v dřeni (Reece, 2011). Takto je zajištěno vylučování močoviny z těla i při snížené produkci definitivní moči. Tímto způsobem odchází z těla 85 % dusíkatých látek (Matouš et al., 2010). Tělo vydá velké množství energie na produkci močoviny a tím odstranění amoniaku. V porovnání s amoniakem je močovina v běžných koncentracích netoxická (Reece, 1998).

3.4.3. Glukóza

Slovo sacharidy vzniklo z latinského pojmu *saccharum*= cukr. Sacharidy mají zcela zásadní význam ve výživě, slouží jako základní živina. Slouží jako energetická zásoba v těle. Chemicky jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony. Dále se dělí podle počtu atomů uhlíků na triózy (3 uhlíky), tetrózy (4 uhlíky), pentózy (5 uhlíků), hexózy (6 uhlíků) atd. (Svačina, 2008). Sacharidy se podle počtu cukerných jednotek dělí na monosacharidy (obsahují jednu cukernou jednotku), disacharidy, oligosacharidy (obsahující 2- 10 cukerných jednotek spojených glykosidickou vazbou) a polysacharidy (obsahující více než 10 cukerných jednotek) a složené sacharidy, které obsahují vedle cukerných jednotek i jiné sloučeniny (Svačina, 2008). Mezi monosacharidy patří glukóza, fruktóza a galaktóza. Sacharóza, laktóza a maltóza jsou zástupci disacharidů (Kittnar et al., 2011). Polysacharidy se dělí na stravitelné, mezi které patří škrob a glykogen, a nestravitelné, jako je vláknina (Holeček, 2006). Hlavní postavení v metabolismu představuje glukóza-6-fosfát, která je výchozí látkou pro syntézu glykogenu, glykolýzu, pentózový cyklus a jako meziproduct při glukoneogeneze a glykogenolýze (Holeček, 2006). Všechny ostatní monosacharidy se metabolickými procesy na glukózu mění a zároveň se z ní tvoří jiné látky tělu potřebné. Hladina glukózy u laboratorního potkana je v intervalu 2,8- 7,5 mmol/l (Knotková et al., 2000)

Cukry, jako jediné, jsou tráveny již v dutině ústní působením α -amylázou (pouze u člověka a prasete), kde se polysacharidy (škrob a glykogen) štěpí na dextriny. Toto trávení je přerušeno v žaludku přítomností HCl v žaludeční šťávě. V duodenu (část tenkého střeva) pokračuje štěpení dextrinu na disacharidy vlivem pankreatické α -amylázy a v dalších částech dochází ke štěpení až na monosacharidy specifickými disacharidázami (Rokyta et al., 2000)

Vstřebávání glukózy do enterocytů probíhá sekundárně aktivním Na^+ kontransportem v duodenu a jejunu díky elektrochemickému gradientu Na^+/K^+ -ATPáze. Glukózový nosič GLUT2 převádí glukózu do portální krve (Kittnar et al., 2011).

3.4.4. Triacylglycerol

Triacylglyceroly jsou hlavní složkou lipidů běžně přijaté v potravě (Holeček, 2006). Jsou to estery neutrálních tuků, které vznikají reakcí mastných kyselin a alkoholu. Triacylglycerol je tvořen třemi molekulami mastných kyselin s jednou molekulou glycerolu (Reece, 1998).

Pro trávení tuků je nejdůležitějším procesem emulgace. Emulgace tuků znásobí celkový povrch tukových částic a zpřístupní je trávicím enzymům. K tomuto procesu dochází ve dvanáctníku působením solí žlučových kyselin. K hydrolytickému štěpení dochází v dalších částech tenkého střeva pomocí pankreatické a střevní lipázy. Účinkem pankreatické lipázy a kolipázy se z triacylglycerolů uvolní mastné kyseliny z poloh 1 a 3 a dává vznik 2 monoacylglycerolů, které se formují do micel. Micely jsou již lehce rozpustné ve vodném prostředí střevního lumenu (Holeček, 2006). Dostávají se do kartáčového lemu a lipidické látky (mastné kyseliny, cholesterol a monoacylglyceroly) se z nich uvolňují. Vznikají strukturně jednodušší látky, jako jsou monoglyceridy nebo diglyceridy, které se váží na žlučové kyseliny a jsou odnášeny k povrchu enterocytů. Zde dochází ke vstřebávání lipofilních látek (Rokyta et al., 2000). Delší mastné kyseliny, monoglyceridy a diglyceridy nevstupují rovnou do krve, ale dostávají se do endoplazmatického retikula, kde se tvoří chylomikra (tukové kapénky) spojením triacylglycerolů, cholesterolů, fosfolipidů a β -lipoproteinů (Kittner, 2011). Pomocí exostózy putují chylomikra do lymfy a posléze hrudním mizovodem do krve (Rokyta et al., 2000).

3.4.5. Cholesterol

Jde o lipidovou látku odvozenou od triacylglycerolu. Chemickou strukturou je cholesterol vysokomolekulární alkohol. Cholesterol v organismu je buď exogenního (z krmiva) nebo endogenního (z acetátu) původu. Cholesterol je součástí každé buňky v lidském těle a je důležitou stavební jednotkou nervů, mozkových buněk a některých hormonů. Cholesterol se podílí na tvorbě buněk, je výchozí látkou pro syntézu steroidních hormonů a žlučových kyselin. Má funkci pro metabolismus, kde představuje zdroj vitamínu D a podílí se na inaktivaci toxických látek (Sova et al., 1990). Většina cholesterolu vytvořeného v těle je v játrech konjugována za vzniku solí žlučových kyselin. Kyseliny jsou přepraveny do střev a podílejí se na trávení (Reece, 1998). LDL (Low Density Lipoproteins) lipoproteiny nízké hustoty transportují cholesterol z jater ke všem orgánům a HDL (High Density Lipoproteins) transportují cholesterol od buněk jednotlivých orgánů do jater, tedy opačným směrem (Rybka, 2007). Chylomikrony jsou částice uskutečňující přenos TAG přijatého potravou ke tkáním. VLDL zajišťují přesun TAG syntetizovaných v játrech do extrahepatálních tkání. LDL dodávají cholesterol do periferních tkání a HDL slouží jako zdroj apo E a C a jsou zodpovědné za zpětný transport cholesterolu z tkání do jater.

Zdroj cholesterolu buňkám zajišťuje LDL. Pro vstup do buňky musí být LDL zachycen LDL-receptory na povrchu buňky. Tyto receptory jsou lokalizovány v opláštěné jamce na povrchu buňky a rozpoznávají lipidy podle obsahu apo-E a apo B_{100} . Následuje receptorová endocytóza, kdy se jamky vchlípí dovnitř buňky a vytvoří obalené váčky, které fúzí s lysozomy. Lysosomální lipasa uvolní cholesterol a ten putuje buď do membrány anebo se ukládá do zásob. Vysoká hladina cholesterolu potlačí expresi genu pro LDL-receptor, způsobí nahromadění v periferních tkáních, vytvoření esterů cholesterolu a nahromadění v buňkách. (Ledvina, 2005). Vysoká hladina cholesterolu je jedním z významných rizikových faktorů srdečně-cévních onemocnění. Tato onemocnění, mezi která patří ischemická choroba srdeční, infarkt nebo mrtvice.

Transport cholesterolu z tkáňových buněk do jater umožňují HDL. HDL získává cholesterol převážně z endotelu buněk a intimy cév. HDL₃ přijímá cholesterol z membrán buněk po koncentračním spádu, odstraní části esterů cholesterolu výměnou za TAG a jsou vychytávány HDL- receptory v játrech anebo se jaterní lipasou změny na HDL₂ (Kittnar et al., 2011).

4. Materiály a metodika

4.1. Materiály

Do studie bylo zařazeno 24 samců laboratorních potkanů kmene Wistar narozených 1. června 2013. Pokus trval 46 dní, po kterých byli jedinci krmeni speciální dietou. Pokus byl započat 12. 7. 2013 a odběry byly provedeny 27. 8. 2013. Potkani byli odchováni ve Fyziologickém ústavu Akademie věd v Praze. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin podle předem zvolené diety. Do skupiny 1 byli zařazeni jedinci značení od čísla 1 až po číslo 6. Tato skupina byla zvolena jako kontrolní skupina, se kterou se porovnávaly všechny biochemické a hematologické hodnoty. Do skupiny 2 patřila zvířata od čísla 7 do čísla 12. Jedinci, s čísly 13 až 18, byli řazeni do skupiny 3. Poslední 4. skupina zahrnovala potkany od 19 po 24. Zkoumal se vliv na biochemické a hematologické hodnoty zvířat po přidavku řepkového šrotu, jako náhrady za šrot sójový. Zvířata byla chována v klecích po 6 kusech podle zvolené diety v krmení. Krmení a napájení bylo potkanům podáváno *ad libitum*. Místnost, ve které byli jedinci odchováni, nemá přirozený zdroj světla. Světelný režim byl upraven automaticky jako střídavý na 12 hodin osvětlení a 12 hodin tmy denně. Průměrná teplota v místě umístění klecí byla 20 °C při relativní vlhkosti 50 %.

4.1.1. Složení krmných směsí

Kompletní krmná směs pro potkany musí být k dispozici neustále. Předkládá se v suchém stavu ve formě granulí. Při krmení touto metodou se nepřetržitě podává pitná voda. Průměrná denní spotřeba pro dospělého potkana je 18 - 20 g směsi. Krmnou směs ST-1 pro myši a potkany vyrábí a dodává firma Velaz s.r.o. .

Skupina 1

Skupině 1 byla podávána kompletní krmná směs ST-1. Kompletní krmná směs se skládala ze 46 % pšenice, 22% sójového extrahovaného šrotu, 12 % rybí moučky, 6 % kukuřice, 5 % pšeničných otrub, 3 % ovsa setého, 2,5 % úsušků píce z vojtěšky mladé, 1,5 % pšeničné krmné mouky, 1,2 % mletého vápence a zbylá procenta připadají na dihydrogenfosforečnan vápenatý, kamennou sůl, DL Methionin, L lysin, vitaminy A, D3, E, síran měďnatý pentahydrát, seleničitan sodný, buthylhydroxyanisol, butylhydroxytoluen a etoxyquin.

Skupina 2

Skupině 2 byla podávána krmná směs jako skupině 1, ale sójový extrahovaný šrot byl ze 30 % nahrazen řepkovým extrahovaným šrotem.

Skupina 3

Skupina 3 dostávala také kompletní krmná směs, ale sójový extrahovaný šrot byl v dietě nahrazen ze 60 % řepkovým extrahovaným šrotem.

Skupina 4

Skupině 4 byla podávána kompletní krmná směs. V dietě již nebyl žádný sójový extrahovaný šrot a všechen byl nahrazen pouze řepkovým extrahovaným šrotem.

4.1.2. Ukončení experimentu

Po ukončení experimentu byla zvířata uspána intraperitoneálním podáním anestetika NARKAMON (obsahují účinnou látku ketamin) o koncentraci 25 mg/ml společně s analgetikem ROMETAR (obsahující účinnou látku mlazin) o koncentraci 10 mg/ml. Obě látky se ředily v přesném poměru 1:1 a dávaly se v množství 0,15 ml na 100 g živé hmotnosti dospělého jedince. Po následném uspání byla zvířatům odebrána krev. Hematologické hodnoty se mohou lišit v závislosti na místě a způsobu odběru krve. V uvedeném pokusu byla krev odebrána injekční stříkačkou ze zadní duté žíly. Krev byla odebrána do zkumavky K₂ EDTA, ze které se stanovovaly ukazatele červeného krevního obrazu.

4.2. Metodika

4.2.1. Stanovení hematologických ukazatelů

Pro stanovení hematologických ukazatelů byl použit hematologický analyzátor MEK-5208 K od firmy NIHON KOHDEN. Hematologické ukazatele byly vyšetřeny z nesrážlivé krve z K₂ EDTA. Takto se měřily z krve erytrocyty (Er), hemoglobin (Hg), hematokrit (Hk) a střední objem erytrocytů (MCV).

4.2.2. Stanovení biochemických ukazatelů

Pro stanovení biochemických parametrů byl využit přístroj spektrofotometr Libra 22 od firmy Fischer Scientific. Při biochemických reakcích se využívá krevní plazma odebraná do heparinu. Takto se měří z plazmy močovina, cholesterol, glukóza, celková bílkovina a triacylglycerol.

Celková bílkovina

Bílkoviny a peptidy poskytují v alkalickém prostředí s roztokem mednaté soli komplex vhodný k fotometrickému stanovení.

Triacylglycerol

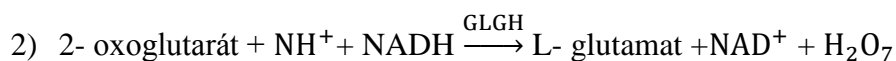
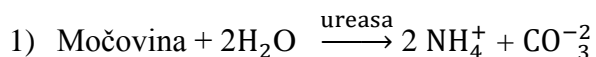
- 1) Triacylglycerol $\xrightarrow{\text{lipasa}}$ glycerol + volné mastné kyseliny
- 2) Glycerol + ATP $\xrightarrow{\text{GK}}$ glycerol- 3- fosfát + ADP
- 3) Glycerol- 3- Fosfát + O₂ $\xrightarrow{\text{GPO}}$ dihydroxyacetonfosfát + H₂O₂
- 4) 2 H₂O₂ + 4- aminoantipyrin + 4- chlorofenol $\xrightarrow{\text{POD}}$ chinominové barvivo + 4 H₂O

GK- Glycerolkinasa, GPO- glycerol- 3- fosfát- oxidasa, POD- peroxidasa

Glukóza

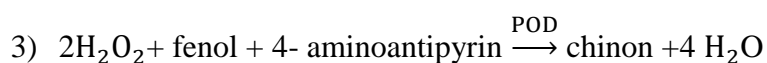
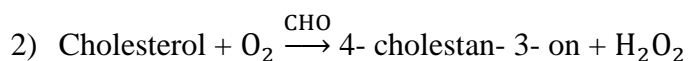
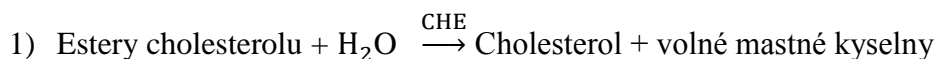
V přítomnosti glukosaoxidasy je glukóza oxidovaná na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje v přítomnosti peroxidasy s fenolem a 4-aminoantipyrinem za vzniku chinoniminového barviva. Intenzita vzniklého růžového zbarvení je úměrná koncentraci glukosy.

Močovina



GLGH- glutamátdehydrogenázy

Cholesterol



CHE- cholesterolesterasa, CHO- cholesteroloxidasa, POD- peroxidasa

Intenzita vzniklého růžovočerveného zbarvení je úměrná koncentraci cholesterolu.

4.2.3. Statistické zpracování získaných hodnot

Výsledky všech měření byly statisticky vyhodnoceny. Pomocí programu Microsoft Exces se stanovovaly základní statistické popisné charakteristiky (průměr hodnot, směrodatná odchylka, rozptyl). Pro porovnání všech jedinců mezi sebou byl použit program Statistika, test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

5. VÝSLEDKY

5.1. Základní statistické hodnoty u biochem. ukazatelů

5.1.1. Glukóza

Tabulka č. 5 Glukóza

Skupina	Průměr (mmol/l)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (mmol/l)	Rozptyl (mmol/l)
Skupina č. 1	9,715	6	1,180	1,392
Skupina č. 2	8,619	5	0,670	0,449
Skupina č. 3	9,771	6	0,963	0,927
Skupina č. 4	10,075	6	1,861	3,463

Tabulka č. 6 Glukóza- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Glukóza (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SC	Stupně volnosti	PC	F	p
Abs. člen	2082,403	1	2082,403	216,6982	0,000000
Skupina	6,420	3	2,140	0,2227	0,879430
Chyba	182,584	19	9,610		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty glukózy získané měřením pro všechny zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 28 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro glukózu uvedeny v tabulce č. 5.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 6. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1.2. Močovina

Tabulka č. 7 Močovina

Skupina	Průměr (mmol/l)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (mmol/l)	Rozptyl (mmol/l)
Skupina č. 1	8,5615	6	2,065	4,264
Skupina č. 2	8,2362	5	0,710	0,504
Skupina č. 3	7,0755	6	0,993	0,986
Skupina č. 4	8,349167	6	1,062	1,128

Tabulka č. 8 Močovina- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Močovina (Tabulka 1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PC	F	p
Abs. člen	1053,916	1	1053,916	557,3970	0,000000
Skupina	9,758	3	3,253	1,7203	0,205642
Chyba	28,362	15	1,891		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty močoviny získané měřením pro všechny zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 28 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro močovinu uvedeny v tabulce č. 7.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přidavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 8. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1.3. Celková bílkovina

Tabulka č. 9 Celková bílkovina

Skupina	Průměr (g/l)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (g/l)	Rozptyl (g/l)
Skupina č. 1	59,45217	6	6,53124	42,67
Skupina č. 2	55,98100	5	12,41249	154,01
Skupina č. 3	54,60050	6	9,10076	82,81
Skupina č. 4	54,62333	6	6,56348	43,03

Tabulka č. 10 Celková bílkovina

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Celk.bílkovina (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	72101,10	1	72101,10	938,8934	0,000000
Skupina	93,95	3	31,32	0,4078	0,749176
Chyba	1459,08	19	76,79		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty celkové bílkoviny získané měřením pro všechna zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 28 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro celkovou bílkovinu uvedeny v tabulce č. 9.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 10. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1.4. Triacylglycerol

Tabulka č. 11 Triacylglycerol

Skupina	Průměr (mmol/l)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (mmol/l)	Rozptyl (mmol/l)
Skupina č. 1	1,370	6	0,753	0,567
Skupina č. 2	1,696	5	0,951	0,904
Skupina č. 3	1,694	6	1,274	1,623
Skupina č. 4	2,165	6	0,670	0,449

Tabulka č. 12 Triacylglycerol- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Triacylglycerol (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SC	Stupně volnosti	PC	F	p
Abs. člen	68,51133	1	68,51133	77,43854	0,000000
Skupina	1,93008	3	0,64336	0,72719	0,548309
Chyba	16,80966	19	0,88472		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty triacylglycerolu získané měřením pro všechna zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 28 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro triacylglycerol uvedeny v tabulce č. 11.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 12. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1.5. Cholesterol

Tabulka č. 13 Cholesterol

Skupina	Průměr (mmol/l)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (mmol/l)	Rozptyl (mmol/l)
Skupina č. 1	1,087	6	0,161	0,025
Skupina č. 2	1,345	5	0,171	0,029
Skupina č. 3	0,907	6	0,292	0,085
Skupina č. 4	0,634	6	0,176	0,031

Tabulka č. 14 Cholesterol- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Cholesterol (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SC	Stupně volnosti	PC	F	p
Abs. člen	22,56097	1	22,56097	518,7617	0,000000
Skupina	1,48268	3	0,49423	11,3641	0,000171
Chyba	0,82631	19	0,04349		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Tabulka č. 15 Cholesterol- Tukeyův test

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Cholesterol (Tabulka1) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PC = ,04349, sv = 19,000				
	Skupina	1 1,0873	2 1,3450	3 0,90700	4 0,63467
1	1		0,208666	0,458256	0,006767
2	2	0,208666		0,012667	0,000277
3	3	0,458256	0,012667		0,142778
4	4	0,006767	0,000277	0,142778	

Hodnoty cholesterolu získané měřením pro všechny zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 28 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro cholesterol uvedeny v tabulce č. 13.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 14. Zde je významný statistický rozdíl mezi hodnotami. Zamítáme nulovou hypotézu H_0 a přijímáme hypotézu H_1 , která říká, že přídavek řepkového šrotu má vliv na hodnotu ukazatele.

Pro podrobnější vyhodnocení byl použit Tukeyův HSD test. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 15. Mezi hodnotami jsou vysoce statistické významné rozdíly (hladina významnosti 0,01) mezi 4. a 1. i 2. skupinou. Statisticky významný rozdíl je i mezi 2. a 3. skupinou.

5.2. Hmotnost

Tabulka č. 16 Hmotnost

Skupina	Průměr (g)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (g)	Rozptyl (g)
Skupina č. 1	487,167	6	12,560	157,754
Skupina č. 2	462,833	6	28,244	797,724
Skupina č. 3	463,5	6	24,842	617,125
Skupina č. 4	500,667	6	45,837	2101,031

Tabulka č. 17 Hmotnost- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Hmotnost (g) (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	5496051	1	5496051	5984,213	0,000000
Skupina	6221	3	2074	2,258	0,112913
Chyba	18369	20	918		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty hmotnosti získané měřením pro všechny zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 27 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro hmotnost jedinců uvedeny v tabulce č. 16.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přidavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 17. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1. Základní statistické hodnoty u hematolog. ukazatelů

5.1.1. Erytrocyty

Tabulka č. 18 Erytrocyty

Skupina	Průměr (T/l)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (T/l)	Rozptyl (T/l)
Skupina č. 1	7,065	6	0,664	0,441
Skupina č. 2	6,942	5	0,312	0,097
Skupina č. 3	7,393	6	0,526	0,277
Skupina č. 4	6,851	6	0,606	0,367

Tabulka č. 19 Erytrocyty- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Erytrocyty (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SC	Stupně volnosti	PC	F	p
Abs. člen	1140,251	1	1140,251	3726,280	0,000000
Skupina	0,995	3	0,332	1,084	0,379664
Chyba	5,814	19	0,306		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty počtu erytrocytů získané měřením pro všechna zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 27 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro počet erytrocytů uvedeny v tabulce č. 18.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 19. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1.2. Hematokrit

Tabulka č. 20 Hematokrit

Skupina	Průměr (%)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (%)	Rozptyl (%)
Skupina č. 1	44,95	6	4,388	19,255
Skupina č. 2	42,96	5	1,671	2,792
Skupina č. 3	46,95	6	2,607	6,796
Skupina č. 4	44,63	6	4,015	16,120

Tabulka č. 21 Hematokrit- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Hematokrit (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PC	F	P
Abs. člen	46025,51	1	46025,51	3938,139	0,000000
Skupina	44,40	3	14,80	1,266	0,314180
Chyba	222,06	19	11,69		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty hematokritu získané měřením pro všechna zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 27 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro hematokrit uvedeny v tabulce č. 20.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 21. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1.3. MCV

Tabulka č. 23 MCV

Skupina	Průměr (fl)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (fl)	Rozptyl (fl)
Skupina č. 1	63,667	6	1,506	2,269
Skupina č. 2	62	5	3,808	14,501
Skupina č. 3	63,333	6	1,506	2,269
Skupina č. 4	65,167	6	3,251	10,569

Tabulka č. 24 MCV- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro MCV (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SC	Stupně volnosti	PC	F	P
Abs. člen	92286,71	1	92286,71	13134,44	0,000000
Skupina	27,98	3	9,33	1,33	0,294926
Chyba	133,50	19	7,03		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty MCV získané měřením pro všechna zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 27 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro MCV uvedeny v tabulce č. 23.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 24. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

5.1.4. Hemoglobin

Tabulka č. 25 Hemoglobin

Skupina	Průměr (g/100ml)	Počet potkanů	Směrodatná odchylka (g/100ml)	Rozptyl (g/100ml)
Skupina č. 1	13,25	6	0,718	0,516
Skupina č. 2	13,12	5	0,249	0,062
Skupina č. 3	13,417	6	0,835	0,697
Skupina č. 4	12,967	6	0,602	0,362

Tabulka č. 26 hemoglobin- ANOVA

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Hemoglobin (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	3983,131	1	3983,131	11212,33	0,000000
Skupina	0,660	3	0,220	0,62	0,611118
Chyba	6,750	19	0,355		

Pozn: SC= součet čtverců, PC= průměrný čtverec, F= testovací kritérium, p= hladina významnosti

Hodnoty hemoglobinu získané měřením pro všechna zvířata jsou uvedeny v tabulce č. 27 v přílohách.

Základní statistické hodnoty, jako jsou průměr hodnot, počet jedinců, rozptyl a směrodatná odchylka, jsou pro hemoglobin uvedeny v tabulce č. 25.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce č. 26. Mezi hodnotami nejsou významné statistické rozdíly. Přijímáme nulovou hypotézu H_0 .

6. DISKUZE

Pokus byl prováděn na 24 jedincích laboratorního potkana kmene Wistar. Potkani byli rozděleni do 4 skupin po 6 jedincích. Skupina 1 s kompletní krmnou dietou pro potkany ST- 1 byla zvolena jako kontrolní skupina. Rozdíl mezi dalšími dietami byl v obsahu řepkového šrotu sloužícího jako náhrada za sójový extrahovaný šrot. Všechny naměřené biochemické a hematologické hodnoty u skupin 1- 3 byly porovnány s kontrolní skupinou a s referenčním rozmezím zdravých jedinců získaný z dostupné literatury.

Pro porovnání skupin mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA. Stanovili jsme hypotézu H_0 : přídavek řepkového šrotu nemá vliv na hodnotu ukazatele. Hodnota p musí být větší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Z hematologických ukazatelů jsem stanovovala: počet erytrocytů, hemoglobin, hematokrit a průměrný objem erytrocytů.

Získané hodnoty počtu erytrocytů se pohybovaly v rozmezí od 6,31 do 8,18 (T/l). Živná (2001) říká, že počet erytrocytů u laboratorního potkana je 9×10^{12} v litru krve. Knotková et al. (2000) uvádí v literatuře pro počet erytrocytů rozmezí 5,5- 9,5 $\times 10^{12}$ / l. Sharp et al. (2013) říká, že počet erytrocytů je u laboratorního potkana 5-10 $\times 10^{12}$ / l. Užší interval hodnot od 7,2- 9,6 $\times 10^{12}$ / l udává Suckow et al. (2006). Získané hodnoty v pokusu odpovídají referenčním hodnotám v dostupné literatuře. Nebyl nalezen žádný signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) mezi skupinami v počtu erytrocytů po zkrmování ŘEŠ.

Získané hodnoty hematokritu se pohybovaly v rozmezí od 40 do 50,8 %. Živná (2001) uvádí, že hematokrit u potkana je v rozmezí 35- 45 % a Sharp et al. (2013) rozmezí od 35- 57%. Ringler et al. (1979) udává hodnotu hematokritu pro potkana v rozmezí 0,39- 0,54 l/l. Knotková et al. (2000) udává užší rozmezí hodnot hematokritu a to v rozmezí 0,36- 0,48 l/l. Získané hodnoty v pokusu odpovídají referenčním hodnotám v dostupné literatuře. Nebyl nalezen žádný signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) mezi skupinami v hematokritu po zkrmování ŘEŠ.

Získané hodnoty hemoglobinu se pohybovaly v rozmezí 11,9 do 14,6 (g/100 ml). Mitruka et al. (1981) ve své literatuře říká, že hodnota hemoglobinu je vyšší u samců než samic, pohybuje se v průměru 14,6 g/ 100 ml. Živná (2001) uvádí, že hodnota hematokritu je u laboratorního potkana v rozmezí hodnot 110- 190 g/l a stejný interval hodnot uvádí i Sharp et al. (2013). Interval 110- 180 g/l hemoglobinu publikuje v literatuře Knotková et al.(2000). Suckow et al. (2006) uvádí průměrnou hodnotu hemoglobinu 15,6 g/ 100 ml. Získané hodnoty v pokusu odpovídají referenčním hodnotám v dostupné literatuře. Nebyl nalezen žádný signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) mezi skupinami v hemoglobinu po zkrmování ŘEŠ.

Získané hodnoty středního objemu erytrocytu (MCV) jsou v rozmezí 56- 71 fl. Živná (2001) publikuje hodnoty MCV v intervalu od 46- 65 fl. Stejný interval hodnot pro MCV od 46-65 fl uvádí ve své literatuře i Sharp et al. (2013). Interval od 55,1 do 64,2 fl publikuje ve své literatuře Suckow et al. (2006). Vyšší hodnoty uvádí Feldman et al. (2000), který stanovil referenční rozmezí v intervalu od 55- 71 fl. Feldmanovo et al. (2000) referenční rozmezí odpovídá námi naměřeným hodnotám. Nebyl nalezen žádný signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) mezi skupinami v MCV po zkrmování ŘEŠ.

Z biochemických kazatelů jsme stanovovali: glukózu, močovinu, celkovou bílkovinu, triacylglycerol a cholesterol.

V našem pokusu se hodnota glukózy pohybovala v rozmezí od 6, 15 mmol/ l do 13, 95 mmol/ l. Živná (2001) a Knotková et al (2000) uvádí nižší referenční rozmezí, než jsou naše naměřené hodnoty. Podle Knotkové et al. (2000) je hladina glukózy u laboratorního potkana v intervalu 2,8- 7,5 mmol/l a Živná (2000) uvádí ještě nižší interval hodnot od 3,21 do 5,67 mmol/ l. Glukózu stanovovali ve svých pokusech i Suckow et al. (2006), kteří udávají rozmezí 4, 55- 10, 37 mmol/ l. Velmi podobný interval hodnot od 4, 97 do 10, 19 publikuje Krinke (2000). Nejvyšší intervalové rozmezí pro glukózu uvádí Sharp et al. (2013). Jeho referenční rozmezí je od 4, 4- 16, 65 mmol/ l, což odpovídá hodnotám našeho naměřeného intervalu pro glukózu. Nebyl nalezen žádný signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) mezi skupinami po zkrmování ŘEŠ.

Získané hodnoty močoviny jsou v rozmezí od 6,36 do 12,73 mmol/l. Živná (2001) ve své publikaci uvádí, že hodnota močoviny je pro laboratorního potkana v rozmezí 1,83 - 3,83 mmol/l. Knotková et al. (2000) ve své publikaci stanovila pro potkany rozmezí hodnot od 0,8 do 3,5 mmol/ l. Všechny námi naměřené hodnoty jsou vyšší než oba zmíněné intervaly. Uličná et al. (2003) uvádí vyšší hodnoty intervalu od 8,5 do 9,3 mmol/ l, který ale nezahrnuje všechny námi naměřené hodnoty. Až interval 8,8- 13,0 mmol/ l, který naměřil Moustafa (1997) odpovídá všem našim hodnotám pro močovinu. Nebyl nalezen žádný signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) mezi skupinami po zkrmování ŘEŠ.

Získané hodnoty celkové bílkoviny jsou v intervalovém rozmezí 34, 715- 68, 063 g/l. Živná (2001) říká, že referenční rozmezí u celkové bílkoviny je 45- 84 g/l. Knotková (2000) udává rozmezí od 56- 76 g/l. Obě referenční rozmezí odpovídají horní hranici námi naměřeným hodnotám. Celkovou bílkovinou se ve svých publikacích zabývá mnoho dalších autorů. Suckow et al. (2006) uvádí interval 55- 66 g/ l, Sharp et al. (2013) 45- 84 g/ l a podobný interval hodnot od 59- 84 g/ l uvádí i Krinke (2000). Námi naměřené hodnota 34,71 je proti ostatním hodnotám nízká. Žádná další hodnota neklesla pod 42 g/ l. Jedná se buď o chybu měření anebo individuální problém jedince. Až na zmíněného jedince nebyl nalezen žádný výrazný pokles ani vzestup celkové bílkoviny po zkrmování ŘEŠ.

Průměrné získané hodnoty triacylglycerolů jsou v intervalu hodnot od 1, 36 až 2, 16 mmol/ l. Suckow et al. (2006) uvádí hodnoty triacylglycerolů v referenčním rozmezí od 0,28 do 1,64 mmol/ l. Triglyceridy v séru v referenčním rozmezí 0,062 - 0,388 mmol/l uvádí ve své literatuře Živná (2000). Obě referenční rozmezí jsou nízká pro naše naměřené hodnoty. Andrijevic (2001) říká, že referenční rozmezí je u laboratorního potkana od 1, 67 do 2, 19 mmol/ l. Rozmezí hodnot od 0,77 do 2,60 mmol/ l naměřili ve svých pokusech i Santos et al. (2000). Poslední zmíněný interval odpovídá všem našim naměřeným hodnotám. Nebyl nalezen žádný signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) mezi skupinami po zkrmování ŘEŠ.

Získané hodnoty u cholesterolu se pohybovaly od 0,38 do 1,50 mmol/l. Průměrná hodnota u skupiny 4 (0,63 mmol/l) je výrazně nižší než ostatní průměrné hodnoty. Průměr hodnot u skupiny 1 (kontrolní skupiny) je 1,087 mmol/l, u skupiny 2- 1,345 mmol/l a skupiny 3- 0,907 mmol/l. Po statistickém zpracování dat testem ANOVA, byly zjištěny vysoké statisticky významné rozdíly (hladina významnosti 0,01) mezi 4. a 1. i 2. skupinou. Statisticky významný rozdíl je i mezi 2. a 3. skupinou. Suckow et al. (2006) uvádí interval hodnot od 1,21 do 2,27 mmol/l. Velmi podobné referenční rozmezí od 1,29 do 2,58 mmol/l publikuje i Krinke (2000). Nejvyšší hodnoty referenčního rozmezí 2,14 až 3,1 mmol/l stanovil ve své publikaci Andrejevic et al. (2001). Žádný referenční interval hodnot neodpovídá námi naměřeným hodnotám pro 4 skupinu.

Cílem diskuze bylo zvyšvit, co je příčinou snížení hladiny cholesterolu při krmení 100 % náhradou ŘEŠ za SEŠ. Hypocholesterolemický účinek (snížený obsah cholesterolu) studuje mnoho vědců již několik desetiletí. Na snížení cholesterolu se podílí nespočet ukazatelů. V diskuzi si zaměříme pouze na takové ukazatele, které mohou být ovlivněny zařazením ŘEŠ do krmiva.

Ikeda et al. (1989) zjistili při pokusech na zvířatech i lidech, že hypocholesterolemický účinek má vláknina. Baranyk et al. (2007) uvádí ve své publikaci složení řepkového semene. Obsah vlákniny v semeni se pohybuje v rozmezí kolem 10 % a Hill (1991) uvádí obsah až 16 % hmotnosti semene. ŘEŠ použit v našem pokusu obsahuje 4,4 % vlákniny. To je v porovnání se SEŠ 2 x více. Účinkem vlákniny je utlumení absorpce cholesterolu nebo žlučových kyselin ve střevě (Kritchevsky, 1978). Solomon et al (1991) prováděl pokusy na jehňatech a uvádí, že obsah cholesterolu je nižší u jedinců krmených dietou s řepkovým šrotem než u zvířat krmených dietou se SEŠ. Vahouny et al. (1978) se v pokusech zabýval celulórou (tj. složka vlákniny). Došel k závěru, že krmení celulórou má významný vliv na snížení absorpce cholesterolu ($P < 0,05$). I přesto, že je absorpce cholesterolu v zažívacím traktu proces komplexní, účinnost závisí hlavně na micelární rozpustnosti a tím i na množství a složení žlučových solí, jakož i mastných kyselin a monoglyceridů, které jsou tvořeny v průběhu trávení působením pankreatické lipázy (Treadwell et al., 1968). Vahouny (1982) říká, že absorpce tuku je úzce spjata s absorpcí cholesterolu. Na tento pokus navázali Ikeda et al. (1989) a dospěli ke zjištění, že absorpce cholesterolu byla významně ovlivněna jak vlákninou ($P < 0,001$), tak i tukem ($p < 0,05$).

Peterson (1951) ve svých pokusech potvrdil domněnku, že fytoosteroly a fytostanoly snižují hladinu cholesterolu. Nejdůležitějším zdrojem fytoosterolů (rostlinné steroly) a fytostanolů jsou rostlinné oleje. Podle Baranyka et al. (2007) řepkový olej obsahuje až 450-780 mg/ 100 g sterolů. Sójový olej obsahuje pouze 180- 410 mg/ 100 g sterolů, což odpovídá polovině obsahu řepkového oleje. Normen et al. (2000) se domnívají, že po proběhlé hydrolyze jsou steroly solubilizovány do micel, ve kterých fytoosteroly a hlavně fytostanoly pravděpodobně vytěsňují cholesterol. Hlavní vlastností fytoosterolů a fytostanolů je, že snižují hladinu celkového a LDL cholesterolu až 10–15 %. Rostlinné stanoly jsou snadněji konzumovatelné a snížení hladiny cholesterolu je vyšší a pravděpodobně i trvalé v porovnání s fytoosteroly (O'Neill, 2005). Další významný hypocholesterolemický účinek mají nenasycené mastné kyseliny. Snížení hladin plazmatického cholesterolu zvýšením zastoupení nenasycených mastných kyselin v dietě je dlouho známý fakt (Grundey et al., 1990). Vlivem nenasycených mastných kyselin na hladinu cholesterolu se zabývali i Cleghorn et al. (2003). Říkají, že pokud se v dietě zvýší zastoupení nenasycených mastných kyselin (hlavně kyseliny linolové, 18:2n-6), dojde ke snížení LDL-cholesterolu o 6 %. Přidá-li se k nenasyceným mastným kyselinám 2 g fytoosterolů ve formě rostlinného tuku, sníží se LDL-cholesterol o dalších 6 %. Řepkový extrahovaný šrot obsahuje podle Baranyka et al. (2007) až 64 % nenasycených mastných kyselin a 22 % kyseliny linoleové. V porovnání se šrotem sójovým, kde je obsah nenasycených mastných kyselin pouze 23 %, je ŘEŠ významným zdrojem. Baranyk et al. (2007) navíc říká, že řepka obsahuje méně nasycených mastných kyselin (5,3g / 100g), které zvyšují hladinu cholesterolu v krvi, než sója (14,5 g/ 100g).

Sova (1990) uvádí, že vysoká hladina cholesterolu je riziková pro vznik aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, infarkt myokardu, cévní mozkové příhody a uzavření tepen dolních končetin. Rokyta (1999) říká, že zvýšený obsah cholesterolu má vedle negativního vlivu na kardiovaskulární onemocnění také vliv na vznik nádorů. Po zhodnocení těchto faktů z dostupné literatury a po důkladném prostudování složení řepkového šrotu a jeho vlivu na cholesterol, lze potvrdit, že ŘEŠ svým složením výrazně snížil hladinu cholesterolu v mém pozorování.

Mimo hematologických a biochemických ukazatelů se stanovoval vliv řepkového extrahovaného šrotu na hmotnost jedinců. Hmotnost potkanů se porovnávala s hmotností kontrolní skupiny a nebyly sledovány žádné signifikantní rozdíly v hmotnostech mezi porovnávanými skupinami ($p > 0,05$).

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjištění a zhodnocení vlivu přídatku ŘEŠ na vybrané parametry červeného krevního obrazu a biochemické ukazatele u laboratorních potkanů albinotického kmene Wistar. Pokus probíhal za spolupráce Fyziologického ústavu v Praze.

Z ekonomických důvodů se hledá náhrada za sójový šrot, která bude mít stejné nebo podobné živinové složení. Byl proveden pokus, zda ŘEŠ je adekvátní náhrada za SEŠ. Pokusným zvířetem byl zvolen laboratorní potkan kmene Wistar. Potkaní samci se krmili po dobu 46 dnů různými typy diet s určitým množstvím přídatku řepkového extrahovaného šrotu, sloužícího jako náhrada za sójový extrahovaný šrot.

Z hematologických parametrů jsem hodnotila: počet erytrocytů, hematokrit, hemoglobin a MCV. Z biochemických parametrů se stanovovala hladina: glukózy, celkové bílkoviny, cholesterolu, triacylglycerolu a močoviny. Změřené výsledky byly statisticky zpracované. Pomocí programu Microsoft Excel se hodnotily statistické popisné charakteristiky (aritmetický průměr, směrodatná odchylka a rozptyl). Pro porovnání skupin (č. 2, 3 a 4) mezi sebou a kontrolní skupinou číslo 1 byl použit test ANOVA v programu STATISTIKA. Výsledky potvrdily hypotézu, že a nebyl zjištěn signifikantně výrazný rozdíl ($p > 0,05$) v žádném hematologickém ani biochemickém parametru až na hladinu cholesterolu v krvi.

Při krmení 100% náhradou řepkového šrotu za šrot sójový bylo zpozorováno výrazné snížení hladiny cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou. Snížená hladina cholesterolu je ze zdravotních důvodů vítána a slouží jako prevence před zdravotními komplikacemi. Po zhodnocení naměřených výsledků a informací z dostupné literatury lze řepku využít jako součást krmné dávky pro laboratorní potkany. ŘEŠ lze považovat za adekvátní náhradu sójového extrahovaného šrotu ve výživě.

8. SEZNAM LITERATURY

Andrijevic, L., Andrijevic, I. 2001. The effect of nucleoside analogues on biochemical parameters in rats' sera. *Archive of Oncology*. 9 (3), str. 155-159.

Baranyk, P., Balík, J., Kazda, J., Kuchtová, P., Soukup, J., Škeřík, J., Volf, M. 2007. Řepka – pěstování, využití, ekonomika. Profi Press s.r.o., s. 208. ISBN: 9788086726267.

Cleghorn, C. L., Skeaff, C. M., Mann, J. et al. 2003. Plant sterolenriched spread enhances the cholesterol-lowering potential of a fat-reduced diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, s. 170-176.

Doubek, J., Doubek, M., Bouda, J., Fuřil, M., Knotková, Z., Pejřilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R. 2003. Veterinární hematologie. NOVIKO a. s. Brno. 464 s. ISBN: 8086542025.

Doubek, J., Šlosárková, S., Řeháková, K., Scheer, P., Beránková, J. 2007. Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. NOVIKO a. s. Brno. ISBN: 8086542165.

Feldman, B., Zinkl, J., Jain, Ch. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 5 th ed. 1344 s. ISBN: 0683306928.

Grundy, S. M., Denke, M. A. 1990. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 31, s. 1149-1172.

Harkness, J., Wagner, J. 1995. The biology and medicine of rabbits and rodents. Williams and Wilkins. Baltimore. 4. ed.

Hill, R. 1991. Rapeseed meal in the diets of ruminants. *Nutrition Abstracts a Reviews*. 61: 139-155.

Holeček, M. 2006. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. Grada Publishing. Praha. 1. vydání. ISBN 978-80-247-1562-9.

Ikedo, I., Tomari, Y., Sugano, M. 1989. Interrelated Effects of Dietary Fiber and Fat on Lymphatic Cholesterol and Triglyceride Absorption in Rats. Laboratory of Nutrition Chemistry, Kyushu University School of Agriculture 46-09, Fukuoka, Japan. *The Journal of Nutrition*. 119(10):1383-1387.

Kazda, J., Škeřík, J. 2008. Metodika integrované ochrany řepky [online]. Studio Petrtýl. [cit. 2014- 3- 10]. Dostupné z <<http://rl.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz-IOR-IOR-repka-c02baa8121.pdf>>.

Kittnar, O. (eds.). 2011. Lékařská fyziologie. Grada Publishing. Praha. 1. vydání. 790 s. ISBN 978-80-247-3068-4.

Knotková, Z., Knotek, Z. 2000. Drobní savci: Fyziologické hodnoty, léky a jejich dávkování. NOVIKO a. s. Brno. 69 s. ISBN: 8090267637.

Krinke, G. 2000. The laboratory rat. ACADEMIC PRESS. London. ISBN: 012426400.

Kritchevsky, D. 1978. Fiber, lipids, and atherosclerosis. *Am.J. Clin. Nutr.* 31: S65-S74.

Ledvina, M; Cerman, J; Stoklasová, A. 2005. Biochemie pro studující medicíny I. a II. Karolinum. Praha. 1. vydání. 480 s. ISBN: 80-246- 0851- 0.

MacMahon, S., Rodgers, A. 1994. Blood pressure, antihypertensive treatment and stroke risk. *J Hypertens Suppl.*

Matouš, B. et al., 2010. Základy lékařské chemie a biochemie. Galén. Praha. 1. vyd. 540 s. ISBN 978-80-7262-702-8.

Mitruka, B., Rawnsley, H. 1981. Clinical biochemici and hematological reference values in normal experimental animals and normal humus. Masson. New Yourk. 2. ed. muscle and adipose tissue from ram lambs. *Journal of Animal Science*, 10: 4055-4061.

Moustafa, S. A. 1997. Age- dependent changers in hematology and clinical chemismy parameters in the rat. *Biomedical Letters*. 55: 83- 90.

Normén, L., Dutta, P., Lia, Å. et al. 2000. Soy sitosterol esters and β -sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, s. 908–913.

O'Neill, F. H., Sanders, T. A. B., Thompson, G. R. 2005. Comparison of efficacy of plant stanol ester and plant sterol ester: short-term and longer-term studies. *Am. J. Cardiol.* 96 (Suppl.), s. 29D-36D.

Pecka, M. 2002. *Laboratorní hematologie v přehledu.* Tiskárna FINIDR s. r. o. Český Těšín. ISBN: 8086682013.

Penka, M., Tesařová, E. 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I.* 1. vyd. Praha: GradaPublishing. 424 s. 978-80-247-3459-0.

Peterson, D. W. 1951. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78, s. 143-147.

Reece, W. O. 1998. *Fyziologie zvířat.* Grand Publishing. Praha 449 s. ISBN: 8071695475.

Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat.* Grand Publishing. Praha. 2. vydání. 480 s. ISBN: 9788024732824.

Ringler, D., Dabich, L. 1979. *Hematology and clinical chemistry.* Academic Press. New York.

Rokyta, R. (eds.). 2000. *Fyziologie.* ISV nakladatelství. Praha. 360 s. ISBN: 8085866455.

Rybka, J. 2007. *Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění: Diagnostické a léčebné postupy.* Grada Publishing. Praha. ISBN 978-80-247-1671-8.

Santos, R. D., Sposito, A. C., Ventura, L. I., Cesar, L. A., Ramires, J. A., Maranhao, R. C. 2000. Effect of pravastatin on plasma removal of a chylomicron-like emulsion in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 85:1163–6.

Sharp, P., Villano, V. 2013. *The laboratory Rat.* CRS Press. Boca Raton. 2.edition. p. 399. ISBN: 9781439889868.

Sharp, P., La Regine, M. C. 1998. *The laboratory Rat.* CRS Press. Boca Raton. p. 214. ISBN: 0849325651.

- Schermen, S.** 1967. The blood morphology of laboratory animals. FA Davis. Philadelphia.
- Solomon, M. B., Lynch, G. P., Paroczay, E., Norton, S.** 1991. Influence of rapeseed meal, whole rapeseed, and soybean meal on fatty acid composition and cholesterol content of muscle and adipose tissue from ram lambs. *Journal of Animal Science*. Oct;69(10):4055-61.
- Sova, Z., Bukvaj, J., Koudelka, K., Kroupová, V., Pješčak, M., Podaný, J.** 1990. *Fyziologie hospodářských zvířat*. SZN. Praha. 2. Vydání. 469 s. ISBN: 8020900926.
- Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., Franklin, C. L.** 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press. Burlington. 2.edition. p. 912. ISBN: 0120749033.
- Suchý P., Straková E., Herzig I.** 2007. Nutriční a dietetická hodnota tuzemských proteinových krmiv jako alternativa sóji a sójových produktů Část II – řepka a řepkové produkty. Vědecký výbor výživy zvířat, VÚŽV Praha. 112 s.
- Svačina. Š. (eds.)**. 2008. *Klinická dietologie*. Grada Publishing. Praha. 1. vydání. 381 s. ISBN: 978-80-247-2256-6 .
- Treadwell, C. R., Vahouny, G. V.** 1968. Cholesterol absorption. In; *Handbook of Physiology- Alimentary Canal*. American Physiology Society, Bethesda, MD. pp. 1407-1438.
- Trojan, S., (eds.)**. 2004. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing. Praha. 4 vydání. 772 s. ISBN 80-247-0512-5.
- Uličná, O., Greksák, M., Vančová, O., Zlatoš, L., Galbavý, Š., Božek, P., Nakano, M.** 2003. Hepatoprotective effect of roobois tea (*Aspalathus linearit*) on CCl₄- induced liver damage rats. *Physiol. Res.* 52: 461- 466.
- Vahouny, G. V.** 1982. Dietary fiber, lipid metabolism, and atherosclerosis. *Fed. Proc.* 41: 2801- 2806.
- Vahouny, G. V. et al.** 1978. Dietary fiber and lymphatic absorption of cholesterol in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 31 : S208- S212.
- Vašák, J. a kol.** 2000. *Řepka*. Agrospoj, Praha, 322 s.

Zeman, L. 1990. Využití řepky a řepkového extrahovaného šrotu ve výživě zvířat v podmínkách ČSFR. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Praha. 37 s. ISBN: 02319470.

Živná, H. 2001. Základy práce s potkanem v laboratoři. Solichte. Hradec Králové. 58 s. ISBN: 8023877615.

9. SEZNAM ZKRATEK

ŘES	řepkový extrahovaný šrot
SEŠ	sójový extrahovaný šrot
PCV	packed cell volume
MCV	střední objem erytrocytu
MCH	hemoglobin erytrocytu
MCHC	střední koncentrace hemoglobinu erytrocytu
MPS	mononuclear phagocytic systém
ADF	acido- detergentní vlákna
NDF	neutrálně- detergentní vlákna
LDL	Low Density Lipoproteins
HDL	High Density Lipoproteins
Er	erytrocyt
Hg	hemoglobin
Hk	hematokrit
TAG	triacylglycerol
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát

10. PŘÍLOHY

Příloha 1: Obrázek č. 1 Hemogram u laboratorního potkana

Příloha 2: Graf č. 1 Závislost cholesterolu (v mmol/ l) u jednotlivých skupin diet

Příloha 3: Graf č. 2 Závislost hmotnosti (v g) u jednotlivých skupin diet

Příloha 4: Tabulka č. 27 Hodnoty červeného krevního obrazu a hmotnosti

Příloha 5: Tabulka č. 28 Biochemické hodnoty