

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

BC. MARKÉTA BURIÁNKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav výživy zvířat a pícninářství



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Vliv zdroje selenu na antioxidační potenciál
laboratorních potkanů**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Pavel Horký, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Markéta Buriánková

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv zdroje selenu na antioxidační potenciál laboratorních potkanů vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu diplomové práce panu Ing. Pavlu Horkému, Ph.D. za odborné vedení, rady a návrhy při zpracování diplomové práce. Také bych velice ráda poděkovala za podporu mé rodiny a přítele po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Buriánková M.: Vliv zdroje selenu na antioxidační potenciál laboratorních potkanů. Diplomová práce, MENDELU, Brno, 90 s.

Cílem diplomové práce bylo experimentálně stanovit vliv různých forem (nanoselen, nanoselen modifikovaný glukózou) a hladin selenu (0 mg, 0,02 mg a 0,02 mg selenu/organismus/den + 0,1 mg glukózy/organismus/den) na antioxidační potenciál modelových zvířat – potkanů.

Bylo použito 18 samců laboratorního potkana outbredního kmene *Wistar albino*, kteří byli rozděleni do tří skupin. Ve skupinách, kde byl aplikován samotný nanoselen došlo k průkazně příznivějšímu účinku na konečnou koncentraci selenu v plazmě a sřevech ($P < 0,05$) oproti kontrole (bez suplementace). Ve skupinách ošetřených nanoselenem modifikovaným glukózou došlo průkazně ($P < 0,05$) k příznivějšímu vlivu na krev o 78,1 % a játra o 111,3% v porovnání s kontrolou. Aplikovaný nanoselen v obou skupinách tedy značně zvyšoval konečnou koncentraci selenu ve tkáních.

U ostatních skupin potkanů doplňování nanoselenu výrazně neovlivnilo konečnou koncentraci selenu ve tkáních.

Antioxidační aktivita tkání se průkazně ($P < 0,05$) zvýšila v plazmě ve skupině, kde byly aplikovány nanočástice selenu modifikované glukózou, a to o 83,6 % v porovnání s kontrolou. Hodnocena byla pomocí antioxidačních metod FR ($P < 0,05$) a FRAP, u které byla většina výsledků bez statistické významnosti ($P > 0,05$).

Obě formy nanoselenu měly vliv na úroveň redukovaného (GSH) a oxidovaného (GSSG) glutathionu. V krvi došlo průkazně ($P < 0,05$) ke zvýšení hladiny GSH. V erytrocytech byly průkazně ($P < 0,05$) vyšší obě skupiny s nanoselenem, kde vyšší účinek na hladinu GSH měla skupina s nanoselenem modifikovaným glukózou, čímž se snížil oxidační stres organismu. V játrech došlo k průkaznému ($P < 0,05$) snížení GSH ve skupině se samotným nanoselenem a v obou skupinách se průkazně ($P < 0,05$) snížily hodnoty naměřeného GSSG.

Z výsledků je patrné, že úrovně nanoselenu a nanoselenu modifikovaného glukózou zvyšovaly koncentrace tohoto prvku ve tkáních organismu zvířat, zvýšily antioxidační aktivitu v plazmě a rovněž hladinu GSH v krvi a erytrocytech.

Klíčová slova: minerální prvek, nanočástice, antioxidanty, glutathion

ABSTRACT

Buriánková M.: Influence of the selenium source on the antioxidant potential of laboratory rats. Diploma thesis, MENDELU, Brno, 90 p.

The aim of this thesis was to experimentally determine influence of various forms (nanoselenium, nanoselenium modified by glucose) and levels of selenium (0 mg, 0,02 mg and 0,02 mg of selenium/organism/day + 0,1 mg of glucose/organism/day) on antioxidant potential of model animals – rats.

It was used 18 laboratory rat males of outbreeding base *Wistar albino*, which were separated to three groups. In groups with application of nanoselenium itself the beneficial effect to the final concentration of selenium in plasma and intestines was confirmed ($P < 0,05$) in contrast to check (without supplementation). In groups treated by nanoselenium modified by glucose had significantly ($P < 0,05$) beneficial effect on blood with increase by 78,1 % and on liver by 111,3 % in comparison with check. Applied nanoselenium in both groups increased final concentration of selenium in tissues. The supplementation of nanoselenium in other groups of rats didn't significantly influenced final concentration of selenium in tissues.

Antioxidant activity of tissues significantly ($P < 0,05$) increased in plasma of group, where the nanoselenium modified by glucose were applied, namely by 83,6 % in comparison with check. It was evaluated by antioxidant methods FR ($P < 0,05$) and FRAP, where most of the results were without statistical significance ($P > 0,05$).

Both forms of nanoselenium had influence on level of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione. In blood the significant ($P < 0,05$) increase of GSH level has occurred. In erythrocytes were significantly ($P < 0,05$) higher both groups with nanoselenium, where higher effect on level of GSH had group with nanoselenium modified by glucose, thereby the oxidation stress of organism was reduced. In liver the significant ($P < 0,05$) decrease of GSH in group with nanoselenium itself has occurred and in both groups the values of GSSG have significantly ($P < 0,05$) decreased.

The results clearly show that levels of nanoselenium and nanoselenium modified by glucose increased concentration of this element in tissues of animal organism, increased antioxidant activity in plasma and also increased level of GSH in blood and erythrocytes.

Key words: mineral element, nanoparticles, antioxidants, glutathione

OBSAH

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | ÚVOD..... | 8 |
| 2 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 9 |
| 2.1 | Selen..... | 9 |
| 2.2 | Oxidační stres | 23 |
| 2.3 | Volné radikály | 24 |
| 2.4 | Antioxidanty | 28 |
| 2.5 | Nanotechnologie ve výživě | 41 |
| 3 | CÍL PRÁCE | 43 |
| 4 | MATERIÁL A METODIKA | 44 |
| 4.1 | Výroba selenových nanočástic a selenových nanočástic modifikovaných glukózou..... | 45 |
| 4.2 | Charakteristika velikosti selenových nanočástic | 46 |
| 4.3 | Příprava plazmy, erytrocytů a jaterních vzorků pro stanovení glutathionu | 46 |
| 4.4 | HPLC-ED analýza glutathionu a jeho optimalizace pomocí FIA-ED | 47 |
| 4.5 | Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP | 48 |
| 4.6 | Metoda stanovení antioxidační aktivity volnými radikály (FR)..... | 48 |
| 4.7 | Mikrovládná digesce pro atomovou absorpční spektrometrii (AAS)..... | 48 |
| 4.8 | Stanovení selenu metodou AAS | 49 |
| 4.9 | Statistická analýza..... | 49 |
| 5 | VÝSLEDKY | 50 |
| 5.1 | Vliv různých forem a hladin selenu na konečnou koncentraci selenu ve tkáních..... | 50 |
| 5.2 | Vliv různých forem a hladin selenu na antioxidační aktivitu | 54 |
| 5.3 | Vliv různých forem a hladin selenu na úroveň GSH a GSSG..... | 60 |
| 6 | DISKUZE..... | 63 |
| 7 | ZÁVĚR | 69 |
| 8 | POUŽITÁ LITERATURA | 70 |
| 9 | SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ | 87 |
| 10 | SEZNAM ZKRATEK | 88 |

1 ÚVOD

Selen je nepostradatelným minerálním prvkem ve výživě lidí i zvířat. Selen přitahuje určitý zájem, protože se jedná o základní živinu pro člověka i zvířata, ale při zvýšených dávkách se proměňuje v toxin. U lidí a dalších organismů je koncentrační rozmezí mezi esencialitou a toxicitou úzké, a proto bývá selen označován jako "esenciální toxin".

Koncentrace tohoto prvku v půdě má vliv jednak na jeho hladiny v krmivech, ale i na jeho obsah v potravinách rostlinného i živočišného původu.

Nedostatek tohoto prvku způsobuje řadu onemocnění, jako jsou kardiovaskulární nemoci a reprodukční poruchy. Ve vyšších koncentracích je však toxický a způsobuje neurologické problémy a kožní poruchy. Problém nedostatku selenu je však vážnější než jeho toxicita.

Selen je součástí enzymu glutathionperoxidázy, který je jeden z nejdůležitějších antioxidantů. V organismu snižuje hladinu volných radikálů, a tím redukuje i oxidační stres. Snížení oxidačního stresu zabraňuje vzniku onemocnění souvisejících s oxidačním stresem, jako je například rakovina.

Selen se může vyskytovat ve formě organické, anorganické a také jako nanočástice. Cílem našeho experimentu bylo zjistit vliv různých forem (nanočástice a nanočástice modifikované glukózou) a hladin nanoselenu (0 mg, 0,02 mg a 0,02 mg selenu/organismus/den + 0,1 mg glukózy/organismus/den) na antioxidační potenciál laboratorního potkana. Byla sledována koncentrace selenu ve tkáních, jako je krev, plazma, játra a střevo. Dále byly sledovány hodnoty redukovaného a oxidovaného glutathionu v krvi, erytrocytech a játrech (GSH a GSSG). Stanovována byla i antioxidační aktivita v erytrocytech, plazmě a játrech pomocí metod FR (Free radicals) a FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay).

Poznatky, které byly tímto experimentem zjištěny, lze aplikovat i v humánní oblasti.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Selen

Mezi mnoha minerály má selen specifické místo a také bývá často označován jako nejkontroverznější stopový prvek, protože rozpětí mezi jeho nezbytností a toxicitou je velmi úzké (Surai, 2006). Důležitost selenu jako základního prvku je v populaci dobře známa a nedostatek tohoto prvku způsobuje vážné zdravotní účinky. Potraviny jsou hlavním přírodním zdrojem selenu a jeho hladiny obecně závisí na úrovni selenu v půdě (Tinggi, 2008).

2.1.1 Historie

Tento prvek objevil švéd Jöns Jacob Berzelius v roce 1817 (Bobrowska-Grzesik, 2013) a ve stejném roce ho pojmenoval jako selen (z řečtiny měsíc) podle Seléné – řecké bohyně Měsíce (Sigel a kol., 2013). Jöns Jacob Berzelius žil v letech 1779–1848 a byl jedním z nejvýznamnějších chemiků své doby (Hatfield a kol., 2012). Berzelius zjišťoval příčiny onemocnění u pracovníků ve výrobním závodě kyseliny sírové a ve spodním kalu přípravku kyseliny našel tento prvek (Sigel a kol., 2013).

První skutečná publikace popisující tento výzkum byla publikována Berzeliiem v roce 1818 ve spisu, ve kterém také označoval tento prvek jako selen. Již během svých prvních studií Berzelius zmínil úzkou podobnost mezi selenem a sírou, které obvykle mají obdobné vlastnosti aminokyselin selenocysteinu a cysteinu obsažených v bílkovinách (Hatfield a kol., 2012).

V roce 1973 Dr. J. T. Rotruck z Univerzity ve Wisconsinu se svými kolegy objevil, že selen je součástí glutathionperoxidázy (GPx), antioxidačního enzymu, který vytváří lidský organismus. Zásluhou tohoto objevu získal selen postavení nepostradatelné živiny. Do té doby byl selen známý jako esenciální pro zdraví jen některých zvířat, což objevili již v roce 1957 Dr. Klaus Schwarz z Národního institutu zdraví v USA a Dr. Milton Scott z Cornellovy univerzity. K tomuto objevu dospěli ve výzkumu degenerace jater u potkanů a nemoci chřadnutí svalů u kuřat (Passwater, 2003).

2.1.2 Charakteristika selenu

Vlastnosti selenu jsou podobné vlastnostem síry (Söhnel, 2010). Elementární selen se vyskytuje v několika alotropických formách. Červený selen (amorfní forma) je termodynamicky nestabilní, rozpustný v sirouhlíku a do jisté míry v benzenu. Černý

sklovitý selen je mírně rozpustný v sirouhlíku. Červené a černé formy jsou elektrické nevodíče. Nejvíce stabilní modifikace (krystalický šestiúhelníkový selen) je kovově šedý.

Jedná se o polovodič a jeho elektrická vodivost se zvyšuje s nárůstem osvětlení (fotovodivosti). Selen vykazuje fotovoltaiickou akci (světlo se transformuje přímo na elektrickou energii) a je schopen přeměnit střídavý elektrický proud na stejnosměrný (Bobrowska-Grzesik, 2013).

Selen se v biologických materiálech nachází v celé řadě sloučenin, které svojí strukturou odpovídají sloučeninám sirným. Jedná se především o aminokyselinu selenocystein, 21. aminokyselinu, která se váže v proteinech (Velíšek a Hajšlová, 2009). S vodíkem tvoří plynné, termicky málo stálé hydridy H_2Se , od nichž se odvozují sloučeniny selenidy. Reakcí oxidů se zásadou vznikají seleničitany, které jsou odvozeny od kyseliny seleničité (Söhnel, 2010).

2.1.3 Výskyt a zdroje

Selen je všudypřítomný (Horký a kol., 2012). Tento prvek se vyskytuje běžně a v zemské kůře je nerovnoměrně rozšířený (Schmidt a Rodrick, 2003). Selen vstupuje do potravního řetězce především prostřednictvím systému půda – rostlina (Bajaj a kol., 2011).

Jeho koncentrace je určena hlavně obsahem v matečné hornině, topografií a klimatem, ale kvůli erozi materiálu, špatnému odvodnění půdy, zavlažování vodou obsahující selen, využití fosfátových hnojiv, vlivem těžby nebo sopečnými výbuchy a spalováním uhlí a ropy se může podstatně zvýšit obsah selenu v půdě (Bajaj a kol., 2011). Při zpracování sulfidických rud a při spalování fosilních paliv obsahujících síru se selen dostává do atmosféry a odtud odplavem do povrchových a podzemních vod (Pitter, 2009). Zpracovávání a spalování fosilních paliv jako uhlí, ropa a vedlejší produkty je tedy významným antropogenním zdrojem selenu.

Ve vyšších koncentracích se selen nachází v minerální složce polétavého a usazeného elektrárenského popílku. Do prostředí se dostává i při výrobě kovů, barev, skla a keramiky. Nezanedbatelným antropogenním zdrojem selenu jsou skládky, a to především skládky elektronických zařízení (fotokopírky). V zemědělských oblastech jsou často zdrojem selenu fosforečná hnojiva obsahující selen jako příměs. V menších

množstvích je tento prvek přítomen v cigaretovém papíru, tabáku a různých kosmetických přípravcích (Krejčová a kol., 2013).

Informací o koncentraci selenu ve vodách je poměrně málo. Nesleduje se příliš často, protože jeho obsah zpravidla nedosahuje limitů přípustných v pitné nebo povrchové vodě. V minerálních vodách se selen obvykle nestanovuje. V mořské vodě se selen nachází v koncentraci cca 4 µg/l. V pitných vodách v ČR se běžně nacházely koncentrace selenu nižší než 10 µg/l. V pitné vodě, balené vodě pro kojence a také pramenité vodě je selen limitován 10 µg/l, což je nejvyšší mezní hodnota. V závlahové vodě by neměla koncentrace selenu překročit 20 µg/l. Všeobecný imisní standard přípustného znečištění povrchových vod je 4 µg/l. V průmyslových odpadních vodách vypouštěných do vod povrchových platí pro odpadní vody z povrchové úpravy kovů a elektrotechnické výroby přípustná dávka selenu 100 µg /l (Pitter, 2009). Obsah selenu ve vybraných potravinách a nápojích je uveden v Tab. 1.

Tab. 1 *Obsah selenu v potravinách a nápojích*
(Navarro-Alarcon a Carbrera-Vique, 2008).

| Typ vzorku | Původ vzorku | Obsah selenu (µg/g) |
|------------------|--------------|---------------------|
| Kravske mléko | Irsko | 0,014–0,018 |
| Jogurt | Řecko | 0,022–0,027 |
| Brambory | Austrálie | 0,030–0,070 |
| Cibule | Indie | 0,127 |
| Chléb | Řecko | 0,070–0,132 |
| Vařené těstoviny | Austrálie | 0,036–0,050 |
| Burské oříšky | USA | 0,075 |
| Vepřová játra | Španělsko | 0,256–0,800 |
| Sardinky | Austrálie | 0,570 |
| Vejce | Řecko | 0,173 |
| Čokoláda | UK | 0,041 |
| Pivo | Austrálie | 0,005 |

V mnoha potravinách rostlinného i živočišného původu je nejdůležitější sloučeninou selenu selenocystein, který se váže v proteinech (Velíšek a Hajšlová, 2009). Potravinovými zdroji selenu jsou mořští živočichové, maso, mléko, vejce, ořechy,

semena a cereálie (Klimešová a Stelzer, 2013). Z toho neupravené celozrnné obiloviny jsou velmi důležitým zdrojem. Selen je obsažen také v česneku a z kategorie ořechů jsou to např. para ořechy. Přestože maso a ryby jsou méně vydatným zdrojem, představují největší zdroj selenu, protože jejich konzumace je relativně vysoká. Většina ovoce a zeleniny neobsahuje jeho významné množství (Passwater, 2003).

V organismech se selen nachází v krvi, kde je obsažen v erythrocytech, ale také v krevní plazmě ve formě selenoproteinů. Největší množství tohoto prvku je uloženo v kosterní svalovině, ledvinách, játrech a slinivce břišní. (Pavlík a Sláma, 2011).

2.1.4 Výskyt v jednotlivých státech

Množství selenu v půdě se výrazně liší v jednotlivých státech (Horký, 2015). V návaznosti na to se hladiny selenu v potravinách mohou výrazně lišit mezi zeměpisnými regiony, což souvisí s hladinami selenu v půdě. Z toho vyplývající velké rozdíly v úrovních selenu v půdě se odráží v širokých variantách stavu selenu zjištěných v lidských populacích po celém světě (Tinggi, 2008).

V rostlinách rostoucích v oblastech s vysokým obsahem selenu v půdě jsou hlavními sloučeninami selenu selenomethylcystein, selenomethion, selenocystathionin a další (Velíšek a Hajšlová, 2009). V současné době může nedostatek selenu nastat v krmivech a potravinách ve střední Evropě (Horký, 2015).

Česká republika patří také mezi oblasti s deficitem selenu v půdě, a tudíž i v potravě. Díky většímu podílu dovážených potravin se zde situace od 90. let zlepšila (Zima, 2007). Ve Finsku jsou půdy i pitné vody obzvláště chudé na selen, a proto se zde do umělých hnojiv začal přidávat seleničitan sodný. Tento krok zapříčinil u finské populace významný vzestup koncentrace selenu v krevním séru (Kasper, 2015).

Na Novém Zélandu, kde byl příjem selenu velmi podobný jako ve Finsku, byla suplementace selenu do krmiv i hnojiv také povolena, avšak pouze v oblastech s nedostatkem půdy a nikoliv na národní úrovni. Úmyslem bylo pomoci napravit onemocnění způsobené karencí selenu u zvířat, ne avšak změnit úroveň příjmu v celonárodní stravě.

Ve Velké Británii došlo k poklesu příjmu selenu a za hlavní důvod je považováno snížení dovozu selenem bohaté severoamerické pšenice, které následovalo po vstupu Britů do Evropského společenství (ES). Americká pšenice byla nahrazena pšenicí s nízkým obsahem selenu převážně britského původu. Kromě toho došlo k poklesu

spotřeby chleba a ostatních pšeničných výrobků, které obvykle dodávají většinu příjmu selenu ve Velké Británii (Reilly, 1998). Výskyt selenu v některých státech je uveden v Tab. 2.

Tab. 2 *Výskyt celkového selenu v půdě vybraných států* (Fordyce, 2013).

| Stát | Celkový obsah selenu ($\mu\text{g/g}$) |
|------------------------|--|
| Spojené státy americké | <0,1–4,3 |
| Anglie/Wales | <0,01–16 |
| Skotsko | 0,115–0,877 |
| Severní Irsko | <0,02–7,8 |
| Čína | 0,02–3,81 |
| Finsko | 0,005–1,241 |
| Srí Lanka | 0,112–5,24 |
| Norsko | 3–6 |
| Nový Zéland | 0,1–4 |
| Malawi | 0,05–0,62 |

2.1.5 Formy selenu

Selen se vyskytuje v anorganických a organických formách a také jako nanočástice. Organické sloučeniny jsou přijímány a v organismu přeměňovány v přibližně 85 až 95 % ve srovnání s anorganickými formami v 40 až 50 %.

Absorpce z potravy závisí na chemické formě (Niedzielski a kol., 2016). Na chemické formě jsou závislé i pozitivní účinky selenu, který byl podáván. Např. bylo prokázáno, že selenomethylselenocystein (SMSeC) poskytuje nejvyšší chemickou ochranu proti rakovině tlustého střeva v porovnání buď se selenomethioninem nebo s anorganickými solemi, jako je např. seleničitan a selenan. Na druhé straně organické sloučeniny selenu nezpůsobují akumulaci selenu v buňkách, a proto může být zabráněno oxidačnímu stresu způsobeného nahromaděním selenu (Mahn a kol., 2009).

Další formou jsou selenové nanočástice, které mají vysokou protinádorovou aktivitu, nízkou toxicitu a antibakteriální vlastnosti, např. inhibice růstu bakterie *Staphylococcus aureus* v přítomnosti selenových nanočástic in vitro (Huang a kol., 2016).

2.1.5.1 Organická forma selenu

Vstřebávání organického selenu probíhá ve formě selenomethioninu a selenocysteinu (Pavlík a Sláma, 2011). Biologická dostupnost sloučenin organických je lepší než anorganických (Zima, 2007).

Doplněk stravy s organickým zdrojem selenu v dietě ve srovnání s anorganickým zdrojem pozitivně ovlivňoval pohyblivost spermií u samců vystavených častému inseminačnímu režimu a pozitivně ovlivnil i schopnost udržet životaschopné spermie v průběhu jejich dlouhodobého skladování. Skutečná schopnost spermií oplodnit vajíčka se jevila zvýšená zásluhou organického selenu. Doplněk stravy v dietě s organickým zdrojem selenu má tedy potenciál pro zlepšení kvality spermatu samců (Speight a kol., 2012).

Pozitivní reakce organického selenu byly zaznamenány také v souvislosti se sekrecí kolostra a mléka a tím zlepšení novorozeneckého zdraví. Organické zdroje selenu, jako je např. selenomethionin, jsou aktivně absorbovány prostřednictvím transportního mechanismu aminokyselin (Mahima a kol., 2012).

2.1.5.2 Anorganická forma selenu

Vstřebávání probíhá ve formě anorganické především jako seleničitan (Pavlík a Sláma, 2011). Anorganické formy selenu se vstřebávají daleko méně účinně v průměru asi z 45 %. A také jejich následné využití a zabudování do látkové přeměny lidského organismu je mnohem nižší (Zadák, 2010).

Typ absorpce závisí na zdroji selenu ve stravě. Anorganické zdroje jako jsou selenáty, se absorbují prostřednictvím jednoduchého difuzního procesu. Během procesu trávení v gastrointestinálním traktu se selen z anorganických zdrojů uvolní a může se opětovně spojovat s ostatními složkami potravy. Dalším způsobem je tvorba nerozpustných komplexů ve střevě a vylučování, čímž se snižuje jeho absorpce přes tenké střevo. V porovnání organické minerály jsou absorbovány aktivně s využitím peptidových nebo aminokyselinových mechanismů vychytávání ve střevě. (Mahima a kol., 2012).

2.1.5.3 Nanočástice selenu

Nanočástice jsou důležité z důvodu jejich charakteristických vlastností a rozsáhlé aplikace v oblasti vědy a techniky. Mezi různými typy nanočástic dosáhl selen značné

pozornosti vzhledem k vyšší biologické dostupnosti, interakci s proteinem, dobré absorpční kapacitě spolu s využitím v lékařské diagnostice a nanotechnologii v biologických systémech (Ramya a kol., 2015).

Biogenní syntéza selenových nanomateriálů spočívá v použití mikroorganismů pro novou syntézu nanomateriálů, která je atraktivní zejména proto, že mikroorganismy jsou levné katalyzátory. Prekurzorové materiály jsou obvykle vyráběny z levných surovin a odpadů. Syntéza nastává při téměř neutrálním pH, okolní teplotě a tlaku a také je zabráněno použití nebezpečných redukčních činidel. Tímto způsobem má selen redukující bakterie dalekosáhlý a dosud nevyužitý potenciál pro biosyntézu jednoprvkového selenu a kovových selenidových nanomateriálů. Tato biosyntéza probíhá za normálních podmínek s použitím selenových prekurzorů z levných surovin nebo odpadních toků (Nancharaiah a Lens, 2015).

Nanočástice selenu přitahují širokou pozornost i proto, že vykazují nové vlastnosti jako je např. velký specifický povrch, vysoká povrchová aktivita, mnoho povrchově aktivních center, vysoká katalytická účinnost a charakter nízké toxicity běžného selenu. Částice nanoselenu mají srovnatelnou účinnost se seleničitanem, selenomethioninem a methylselenocysteinem při regulaci selenoenzymů a bylo pozorováno výrazné snížení akutní toxicity (Shi a kol., 2010).

V současnosti je informováno o vlastnostech nanometrických částic jako o antioxidačních, protirakovinných a také jako o vlastnostech, které inhibují biofilm (Ramya a kol., 2015). Podávání nanoselenu výrazně zlepšilo kvalitu spermií, spermatogenezi, došlo ke snížení toxického stresu způsobeného volnými radikály a také bylo omezeno poškození spermatické DNA. Selenové nanočástice mohou být užitečné pro prevenci toxicity gonád prostřednictvím jejich antioxidačního potenciálu. V tomto důsledku by bylo vhodnější použít neobvyklou formu selenu s výrazně nižší toxicitou a vyšší účinností (Rezvanfar a kol., 2013).

2.1.6 Potřeba, doporučený příjem

Nasycení selenoproteinem P (SePP) v plazmě se používá jako kritérium pro odvození referenční hodnoty pro příjem selenu u dospělých (Kipp a kol., 2015). Referenční hodnoty pro příjem živin DACH jsou společně vydávány výživovými společnostmi v Německu, Rakousku a ve Švýcarsku, a tedy zkratka DACH odpovídá mezinárodně běžnému označení těchto zemí pro Německo – D, Rakousko – A a pro Švýcarsko – CH

(Kasper, 2015). Použitím referenčních tělních hmotností vycházejících z referenčních hodnot DACH (70,7 kg u mužů a 60 kg u žen), jsou výsledné odhadované hodnoty pro příjem selenu 70 µg/den pro muže a 60 µg/den pro ženy. Tyto referenční hodnoty jsou vypočteny pro normální hmotnosti dospělých.

Údaje týkající se požadavku selenu pro děti a dospívající nejsou k dispozici. Proto jsou referenční hodnoty pro děti a dospívající založeny na hodnotách vypracovaných pro dospělé a jsou vypočteny s ohledem na rozdíly v tělesné hmotnosti včetně kolísavých růstových faktorů, které zohledňují nároky na růst. Růstové faktory byly vypočteny jako úměrné zvýšení potřeby bílkovin pro růst vzhledem k jeho nárokům na výživu v různém věku.

Při použití věkových skupin a posouzení tělesné hmotnosti jsou referenční hodnoty založeny na vyplývajících odhadovaných hodnotách pro příjem selenu, které jsou následující: od 1 až po 4 roky je potřeba 15 µg/den, od 4 do 7 let 20 µg/den, od 7 do 10 let 30 µg/den, od 10 až 13 let 45 µg/den a od 13 až 15 let 60 µg/den. Ve věku od 15 až po 19 let u chlapců je výsledná odhadovaná hodnota pro příjem selenu 70 µg/den a pro dívky stejného věku je tato hodnota 60 µg/den.

Odvození referenční hodnoty pro příjem selenu u kojenců ve věku 0 až 4 měsíce je založeno na obsahu selenu v mateřském mléce, které je považováno za optimální stravu pro kojence. K nemocem z nedostatku selenu došlo v Číně, kde je obsah selenu z mateřského mléka nižší než 0,3 µg/100 ml. V Německu je obsah selenu z mateřského mléka přibližně 1,5 µg/100 ml. Obsah selenu naměřený v mlezivu je dvakrát vyšší než ve zralém mateřském mléce. Vzhledem k tomu, že je průměrný příjem mateřského mléka 750 ml/den, je příjem selenu ve výsledku přibližně 11 µg/den. Odhadovaná hodnota pro adekvátní příjem selenu u kojených dětí ve věku 0 až 4 měsíce je indikována jako 10 µg.

Spolu se zaváděním pevné stravy, spotřeba mateřského mléka klesá. Protože k dispozici nejsou žádná data pojednávající o příjmu selenu prostřednictvím pevné stravy, využívá se pro odvození referenční hodnoty pro kojence od 4 měsíců předpokládaná hodnota pro kojence ve věku 0 až 4 měsíce. Vezmeme-li v úvahu rozdíly týkající se průměrné tělesné hmotnosti, byla pro kojence ve věku 4 až 12 měsíců odvozena odhadovaná hodnota 15 µg/den.

Během těhotenství je požadováno mírné zvýšení příjmu selenu pro těhotné ženy za účelem krytí potřeb plodu. V průměru toto zvýšení představuje hodnotu 2 µg/den.

Protože je však dodatečný příjem zanedbatelný, je odhadovaná hodnota pro příjem selenu v průběhu těhotenství indikována na 60 µg/den (Kipp a kol., 2015).

Koncentrace selenu by měla být zvýšena i během laktace. Tento nárůst je pozorován nejen v krvi, ale i v mléce, z něhož selen rovněž přechází do mlád'at (Horký a kol., 2013). Potřeba selenu u žen se tedy zvyšuje během kojení vzhledem k množství selenu, který je vylučován v mateřském mléce při krmení dítěte. Přibližně 11 µg selenu za den je mateřským mlékem vylučováno. Přihlédnutím k úrovni biologické dostupnosti ve výši 70 % je během kojení zapotřebí dalších 16 µg/den. Odhadovaná hodnota pro příjem selenu u kojících žen činí 75 µg/den. Hodnoty pro doporučený denní příjem selenu jsou uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 *Odhadované hodnoty pro adekvátní příjem selenu (Kipp a kol., 2015).*

| Věk | Selen [µg/den] | | |
|----------------------------|----------------|------|------|
| | Děti | Muži | Ženy |
| Kojenci: | | | |
| 0 až 4 měsíce | 10 | | |
| 4 až 12 měsíců | 15 | | |
| Děti a dospívající: | | | |
| 1 až 4 roky | 15 | | |
| 4 až 7 let | 20 | | |
| 7 až 10 let | 30 | | |
| 10 až 13 let | 45 | | |
| 13 až 15 let | 60 | | |
| 15 až 19 let | | 70 | 60 |
| Dospělí: | | | |
| 19 až 25 let | | 70 | 60 |
| 25 až 51 let | | 70 | 60 |
| 51 až 65 let | | 70 | 60 |
| 65 let a starší | | 70 | 60 |
| Těhotné ženy | | | 60 |
| Kojící ženy | | | 75 |

2.1.7 Funkce selenu

Pro lidský organismus je selen prvek esenciální, v nízkých koncentracích účinkuje jako antioxidant (Krejčová a kol., 2013), má schopnost aktivovat buňky obranného systému organismu a chrání ho tak proti závažným onemocněním např. rakovinným nádorům (Horký, 2015). Suplementace selenem tedy může být účinný prostředek snižování rizika

rakoviny (Surai a Taylor-Pickard, 2008), např. prostaty (Passwater, 2003). Selen hraje důležitou roli i ve správném pořadí fyziologických funkcí, a to zejména u hospodářských zvířat (Horký a kol., 2012).

Silná antioxidační schopnost selenu může organismus chránit proti onemocněním srdce, stárnutí a artritidě. Selen hraje roli v prevenci zánětu, pomáhá tělu využívat energii, ochraňuje játra před poškozením a zúčastňuje se detoxikace kovů jako je olovo, zinek, rtuť a kadmium. Rovněž pomáhá lidskému organismu v produkci koenzymu Q10 – enzymu důležitého pro správnou činnost srdce a nepostradatelný je kromě toho pro funkci spermií, a tím pro mužskou plodnost (Passwater, 2003). Selen nejen u zvířat ovlivňuje kvalitu ejakulátu samců, ale účastní se i reprodukčních procesů mladých samic (Horký a kol., 2012).

Doplnění selenu v potravě zvířat během březosti zvyšuje počet novorozených mláďat a také jejich životaschopnost v pozdějším věku (Horký a kol., 2013). Velký význam má i pro imunitní soustavu, kde podporuje fagocytární účinek bílých krvinek a tvorbu protilátek. Tento prvek kromě toho vykonává funkci katalyzátoru v enzymatických systémech (Pavlík a Sláma, 2011). Další funkce v organismu je jeho potřeba při správném pohlavním vývoji, pro zdravou kůži i vlasy a také pro zachování dobrého zraku (Klimešová a Stelzer, 2013).

Selenoproteiny podporují metabolismus hormonů vzhledem ke zlepšení činnosti štítné žlázy (Horký, 2015). Selen je rovněž životně důležitý pro mozek a vzhledem k tomu bylo prokázáno, že se podílí na různých funkcích centrálního nervového systému, jako je motorický výkon, koordinace, paměť a poznávání (Solovyev, 2015).

2.1.8 Metabolismus selenu

Vstřebávání selenu do organismu je vázáno červenými krvinkami, krevním albuminem, plazmovým globulinem a přepravovanými tkáněmi (Niedzielski a kol., 2016). Vstřebávání selenu a jeho sloučenin probíhá také podobně jako u ostatních prvků ve dvanáctníku, v menší míře i v tlustém střevě (Pavlík a Sláma, 2011). V duodenu probíhá vstřebávání především ve formě selenomethioninu (obsažený v rostlinách) a selenocysteinu.

Komerční přípravky, kde je selen obsažen ve formě selenitu nebo selenátu, se také dobře vstřebávají. Resorpci snižuje vláknina, zinek, vápník, kadmium ale i rtuť. Poruchy resorpce vznikají při Crohnově chorobě. Selen se funkčně uplatňuje díky

přítomnosti v selenocysteinu, který se inkorporuje do selenoproteinu (Zima, 2007). Primární distribuce probíhá v játrech, potom ve slezině a ledvinách, nejméně v mozku a svalové tkáni. U zvířat se při dlouhodobém vystavení účinku selenu distribuce rozšiřuje o srst. Je rovněž schopen přestupovat přes placentu a způsobit tak vrozené malformace u plodu (Zapletal, 2001).

Selen v játrech je u jedince obecně považován za vyhovující ukazatel stavu selenu. Hodnota selenu v lidských játrech se pohybuje od 200 do 2300 $\mu\text{g/g}$ živé hmotnosti. Koncentrace glutathionu a selenu je 2–3 \times vyšší v jaterních buňkách než v erytrocytech, což udává mnohem vyšší enzymatickou aktivitu v játrech, pravděpodobně v souvislosti s detoxikačními procesy peroxidačních látek v játrech.

V játrech byla buněčná glutathionperoxidáza detekována jako nosič endogenního selenu a bylo pozorováno, že podávaný selen jako seleničitan byl červenými krvinkami navázán velmi rychle. Poté byl redukován glutathionem na selenid, který byl po jeho změně transportován do plazmy, kde je selektivně vázán na albumin a pak přenesen do jater. Na druhé straně selenan se navázal buď přímo v játrech nebo byl vyloučen močovými cestami. Selenoprotein P byl detekován v játrech a z tohoto důvodu se předpokládá, že tento protein slouží jako transportní médium pro selen. Poté bylo zjištěno, že tento protein dodává selen z jater do jiných orgánů.

Asi 75 % z celkového počtu selenu v krvi je přítomno v plazmě/séru. Hladiny v plazmě a séru odrážejí poslední příjem živin jednotlivce, a tudíž mají souvislost s krátkodobým stavem selenu. Na druhé straně jsou erytrocyty markery pro dlouhodobý stav užívání selenu. Lze předpokládat, že červené krvinky odrážejí příjem selenu během jejich doby životnosti (120 dní). Aktivita glutathionperoxidázy se často měří ve veškeré krvi nebo krevních destičkách, protože tento parametr je považován za vhodný ukazatel stavu selenu a snižuje se, pokud je dosaženo nedostatku (Dumont a kol., 2006).

Resorpce selenu je závislá na složení diety, především obsahu protichůdně působících látek jako je síra a rtuť. Selen je z organismu vylučován výkaly, močí, mlékem a plícemi (Pavlík a Sláma, 2011). Selen zasahuje do metabolických dějů za následujících fyziologických a patologických stavů: jako součást jodthyroninových dejodáz se selenoproteiny zúčastňují i metabolismu hormonů štítné žlázy (Zima, 2007). Naopak vliv zvýšené suplementace jódu neovlivnil metabolismus selenu ani fungování hormonů štítné žlázy. Doplnění jódu do organismu nevykazuje žádný negativní účinek na hodnoty selenu v krvi, ale lze předpokládat, že dochází k poklesu absorpce

selenu na základě sníženého vylučování močí (Pechová a kol., 2014). Také při poruchách funkce placenty může dojít k nedostatku selenu v plodu v posledním trimestru, avšak při narození už mívají nedonošené i donošené děti stejné koncentrace selenu. U nedonošených dětí s nižšími zásobami selenu v játrech se koncentrace během tří měsíců snižují.

Selen se zúčastňuje spermiogeneze ve spermatocytech a jeho deficit může vést k mužské neplodnosti. Nutný je i pro metabolismus testosteronu. Selen je rovněž nutný pro buněčnou imunitu, především pro funkci T-lymfocytů. Má velký význam i při výskytu a progresi AIDS. Při jeho deficitu v organismu viry snadno podléhají mutacím a vznikají jejich virulentnější formy (Zima, 2007).

2.1.9 Deficit a toxicita selenu

Dietní nedostatek selenu má vliv na původ kardiovaskulárních chorob (Surai a Taylor-Pickard, 2008). Klinické příznaky deficitu selenu lze rozdělit do dvou skupin: specifické klinické projevy (bilá svalová onemocnění, exudativní diatéza, hepatóza, onemocnění srdce) a nespecifické: na selen citlivé poruchy.

Nespecifické poruchy jsou většinou prezentovány v podobě reprodukčních poruch, zvýšené perinatální úmrtnosti, imunodeficiencí, snížením produkce mléka a růstové intenzity, atd. Poruchy citlivé na selen mohou mít u hospodářských zvířat vliv na zdravou produkci stáda a reprodukci (Pechová a kol., 2015).

Protože je selen nepostradatelnou mikroživinou pro mnohé organismy včetně člověka, jsou v tomto důsledku nedostatky selenu v potravě (<40 µg/den) spojeny s různými zdravotními problémy jako např. Keshanská a Kashin-Beckova nemoc (Basu a kol., 2007). Příčinou nedostatku selenu v půdě vznikl název Keshanská nemoc podle oblasti Keshan v Číně, kde děti trpěly kardiomyopatiemi (Zima, 2007). Keshanská nemoc je druhem kongestivní kardiomyopatie – postižení vlastního srdečního svalu a Kashin-Beckova nemoc je těžká deformující forma artritidy – zánět kloubů (Mach 2012).

V důsledku nedostatku selenu v organismu vzniká řada dalších nemocí, které mají podobné klinické příznaky jako avitaminóza případně hypovitaminóza vitamínu E. Nejrozšířenější je svalová dystrofie a exudativní diatéza. Mimo jiné dochází rovněž k poruchám reprodukce provázených neplodností samic a degenerací semenotvorných

kanálků samců. Karence selenu je spojená se sníženou obranyschopností organismu (Pavlík a Sláma, 2011).

Selen je tedy nezbytným prvkem např. pro reprodukci samců, a to navzdory skutečnosti, že je považován za látku způsobující toxicitu u zvířat po mnoho let (Horký a kol., 2012). Otravy bývají doprovázeny paralýzou organismu a patologickými změnami na játrech a ledvinách. Intoxikace selenem může být u zvířat zapříčiněna vysokými dávkami seleničitanu v krmné dávce. (Pavlík a Sláma, 2011). Nedostatek vitamínu E zvyšuje toxicitu selenu a na druhou stranu vysoké dávky selenu snižují hladinu vitamínu A (Svačina, 2010).

Toxicita je obecně způsobena tím, že selen se svými chemickými vlastnostmi podobá síře, a proto ji může nahrazovat v aminokyselinách cysteinu a methioninu. Při vyšších koncentracích tím poškozuje funkci enzymů, což jsou proteiny (Hála, 2013). Selen byl považován za toxický zejména při předávkování (Horký a kol., 2013). Tento prvek se při vyšších koncentracích usazuje v játrech, ledvinách a také ve slezině (Krejčová a kol., 2013). Překročení tolerovatelné horní hranice dávky 400 µg/den může způsobovat kožní vyrážky, srdeční problémy, odlupování nehtů, nervové problémy až smrt (Sircus, 2014).

Rozpětí mezi prospěšnými účinky z příjmu selenu a toxickými účinky je však pozoruhodně úzké a obecně se uznává, že konzumace vysoké hladiny selenu může být karcinogenní i teratogenní (Basu a kol., 2007). Některé účinky nadbytku a rovněž nedostatku selenu jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Účinky nedostatku a nadbytku selenu u zvířat a lidí (Nancharaiyah a Lens, 2015).

| Nedostatek selenu – nižší příjem než bezpečná dávka | Nadbytek selenu - nad horní přijatelnou mez |
|--|--|
| Poškození imunitních reakcí | Změna barvy kůže |
| Problémy se štítnou žlázou | Česnekový zápach dechu |
| Zvýšené riziko rakoviny | Deformace a ztráta nehtů |
| Cirhózy jater a slinivky břišní | Nedostatek duševní bdělosti |
| Kardiovaskulární onemocnění | Zarudnutí kůže, kožní vyrážka |
| Abnormální zubní kaz | Onemocnění srdce |
| Keshanská a Kashin-Beckova nemoc | Selenóza (otrava selenem) |

2.1.10 Selen ve funkčních potravinách

Funkční potravina je jakákoli potravina, která má kromě výživové hodnoty pozitivní účinek na zdraví konzumenta, jeho psychický i fyzický stav. Je to potravina vyrobená z přirozeně se nacházejících složek. Konzumovat by se měla jako součást každodenní stravy.

Funkční potraviny tvoří přechodnou kategorii potravin mezi běžnými (konvenčními) potravinami a léky. Jejich cílem není léčit onemocnění, ale spíše mít preventivní účinek. Funkční potraviny by měly být konzumovány běžně jako složka stravy. Nejsou jimi tzv. doplňky stravy ve formě vitamínů, stopových prvků, přirozených antioxidantů a jiných látek zařazených mezi nutraceutika, která se prodávají ve formě obvyklé pro léky – tablety, kapsle, extrakty (Kastnerová, 2011).

Konzumace funkční potraviny ovlivňuje některé pochody v organismu, zejména posiluje přirozené obranné mechanismy proti škodlivým vlivům prostředí. Rovněž pozitivně ovlivňuje fyzický i duševní stav a zpomaluje proces stárnutí (Kalač, 2003). Kromě účinku suplementace selenem na zdraví zvířat a lidí je dalším důležitým aspektem vliv selenu na kvalitu a složení potravin, např. ovlivnění kvality masa, mléka, vajec nebo spektra mastných kyselin (Pechová a kol., 2015).

2.1.10.1 Vejce obohacená selenem

Pozitivní možností jak obohatit vejce selenem je zkrmovat organický selen nosnicím (Kalač, 2003). Množství selenu ve vejcích je tedy snadno manipulovatelné při krmení slepic selenomethioninem (Bennett a Cheng, 2010). Obsah 0,4 µg/g selenem obohacených kvasnic přidávaných do krmiva vedl k obsahu 30 µg ve vejci. Toto množství obsahuje cca polovinu doporučené denní dávky selenu, jehož příjem potravou je v České republice silně nedostačující.

Vejce od nosnic z malochovů, které mají svobodný přístup k přirozeným zdrojům své potravy, obsahují mnohem více n-3 nenasycených mastných kyselin, karotenoidů (především luteinu) a vitamínu E než od nosnic chovaných ve velkovýrobních podmínkách. Kvůli tomu byla vyvinuta taková krmiva, která umožňují velmi výrazné obohacení vajec těmito potřebnými složkami a navíc i selenem (Kalač, 2003).

Bylo prokázáno, že vejce obohacená selenem jsou vhodným zdrojem selenu pro člověka. Kromě toho jsou vejce tradiční a cenově dostupné potraviny v mnoha zemích

a kulturách, a z toho důvodu by měla být vejce obohacená selenem vítaná (Bennett a Cheng, 2010).

Použití organického selenu vyzdvihuje vejce obohacená selenem nad úroveň, kterou je možno získat prostřednictvím seleničitanu sodného, což může mít za následek několik užitečných aplikací. Za prvé, při výrobě konzumních vajec může být organický selen použit pro výrobu nutričně vylepšených vajec a vzhledem k tomu by spotřeba vajec se zvýšeným obsahem selenu mohla významně přispět k doporučeným denním dietním příjmům. Za druhé, při výrobě násadových vajec by vejce obohacená selenem mohla být užitečná pro zlepšování obsahu selenu u embrya během inkubace a nově vylíhlých mláďat (Sim a kol., 2000).

2.2 Oxidační stres

Oxidační stres je tzv. zvýšení hladiny volných radikálů (např. ROS – reaktivních forem kyslíku) v buňkách, kde se hromadí ve vyšším než normálním množství. Oxidační stres můžeme rovněž nazvat jako fyziologický stav, který se nachází tam, kde dochází k významné nerovnováze mezi tvorbou ROS a antioxidačními mechanismy (Schmidt, 2008).

Rychlé množení buněk a aktivní aerobní metabolismus jsou často spojeny s produkcí reaktivních forem kyslíku. Reaktivní formy kyslíku, které jsou nevyhnutelným vedlejším produktem aerobního metabolismu, vznikají při přenosu elektronů, který probíhá v mitochondriích, chloroplastech a peroxisomech. ROS jsou toxické molekuly a pokud není regulována jejich koncentrace, mohou způsobit poškození proteinů, membrán, DNA a v konečném důsledku buněčnou smrt (Zein Eldin a Ibrahim, 2015).

Nízké hladiny ROS jsou nepostradatelné v mnoha biochemických procesech, včetně intracelulárního zasílání zpráv při diferenciaci buněk a buněčném vývoji nebo vliv na zastavení růstu, apoptózu, imunitu a obranu proti mikroorganismům. Oproti tomu vysoké dávky nebo nedostatečné odstranění ROS mají za následek oxidační stres, což může způsobit vážné metabolické poruchy a poškození biologických makromolekul (Matés a kol., 1999). Předpokládá se, že oxidační stres je hlavní příčinou dysfunkce spermií, protože spermie obsahují vysoké množství polynenasycených mastných kyselin (Shi a kol., 2010).

Oxidační stres a buněčná apoptóza mohou zničit imunitní buňky, a tím negativně ovlivnit imunitní obranné schopnosti. Apoptóza představuje velmi důležitou funkci v udržování stability prostředí, a to jak apoptóza v mitochondriích vyvolaná vnitřní cestou, tak i smrt receptoru vyvolaná vnější cestou (Wang a kol., 2015).

2.3 Volné radikály

Oxidační procesy vznikají v organismu člověka kromě tvorby iontů při heterolytickém štěpení $A-B \rightarrow A:^- + B^+$ i tvorbou volných radikálů za pomoci homolytického štěpení $A-B \rightarrow A^\cdot + B^\cdot$ (Melo a kol., 2012).

Volné radikály jsou látky (ionty, atomy, molekuly), které jsou schopné samostatné existence a ve svém elektronovém obalu mají nepárový elektron, případně více nepárových elektronů. Vznikají z normální částice ztrátou nebo přijetím elektronu. Volné radikály usilují o doplnění chybějícího elektronu, protože stabilní konfigurace vyžaduje párové seskupení elektronů. Následkem je nízká stabilita a vysoká reaktivita většiny volných radikálů. Volný radikál získá chybějící elektron, setká-li se s jiným radikálem, častěji však vytržením elektronu z nepoškozené molekuly. Z této molekuly se pak stává radikál, který může napadnout jinou sloučeninu a opět ji přeměnit na radikál. Započne se tak řetězová reakce, která vede k poškození řady molekul (Racek, 2003).

Volné radikály mají oxidační účinek, protože úbytek elektronů je z elektrochemického hlediska oxidace (Racek, 2003). Selen má významnou funkci při ochraně proti poškození tkání volnými radikály, a proto je nedílnou součástí antioxidační kapacity organismu (Horký a kol., 2013). Tento prvek je tedy jednou ze základních látek, která má dopad na ochranu buněk, protože spolu s dalšími látkami může udržovat nízké koncentrace reaktivních kyslíkatých látek ve tkáních (Fröhdeová a kol., 2014).

2.3.1 Vznik a negativní působení

Volné radikály se mohou do organismu dostávat zvenčí, avšak velké množství vzniká i v průběhu metabolismu. Podle toho se rozdělují příčiny vzniku volných radikálů na exogenní a endogenní. K exogenním příčinám patří ionizující paprsky (γ záření), ultrafialové záření, vysoký obsah nečistot ve vzduchu (tepelné elektrárny, průmysl a doprava), kouření, intoxikace (polychlorované bifenyly, chloroform – volné radikály

vznikají až při metabolismu těchto látek), potrava (volné radikály vznikají při tepelné úpravě, drcení, vlivem světla atd.).

Mezi endogenní příčiny vzniku volných radikálů patří především vznik kyseliny močové (např. při úrazech, nekrotách a pooperačních stavech), rozpad fagocytů a makrofágů (záněty, popáleniny, septický stav), vznik methemoglobinu, zvýšený metabolismus estrogenů, hyperglykémie a další (Racek, 2003).

Volné radikály a oxidanty se podílejí na fyziologických odpovědích i na mnoha chorobách (Forman a kol., 2015). K přímým účinkům ROS na buňky patří i poškození enzymů a strukturálních proteinů, peroxidace lipidů, mitochondriální dysfunkce a ROS také narušují intracelulární redoxní procesy, snižují hladinu antioxidantů (zejména glutathionu – GSH) a oxidují další intracelulární thioly (Gabryel a kol., 2016).

Reaktivní kyslíkové částice reagují s blízkými molekulami např. proteinů, lipidů, DNA a RNA a upravují jejich strukturu a funkci, což vede např. k akutním i chronickým plicním toxicitám (Zhang a kol., 2015). Oxidační stres vyvolaný cévní endoteliální dysfunkcí je prvním klíčovým krokem v patogenezi ischemického poškození. Nerovnováha mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a schopností endotelu je zničit, vede k agregaci destiček, ztrátě vazodilatace a zánětu (Gabryel a kol., 2016).

V současné době je dobře známo, že řada volných kyslíkových radikálů a dalších reaktivních forem kyslíku přispívá k patologii mnoha poruch zahrnující aterosogenezi, neurodegeneraci, chronický zánět, rakovinu a fyziologické stárnutí (Deng a kol., 2011).

2.3.2 Příklady volných radikálů

Mezi volné radikály patří látky, které okamžitě reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé soustavy. Nejčastěji se setkáváme s reaktivními formami kyslíku – ROS a dusíku – RNS (Štípek, 2000).

Termín ROS obecně vzato zahrnuje počáteční složky generovaných redukovaných kyslíků (superoxidu a peroxidu vodíku), jakož i jejich sekundární reaktivní produkty (Forman a kol., 2015). ROS vznikající v průběhu aerobního dýchání a oxidace substrátu jsou zapojené do řady biologických procesů, včetně stimulace přenosu signálů, zprostředkování buněčné apoptózy a obrany proti invazi mikrobiálních patogenů.

Nadměrné hromadění ROS způsobuje škodlivé účinky buňkám oxidativním poškozením proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Důsledkem udržování ROS na optimální úrovni je velmi důležité pro přežití aerobních organismů (Bathige a kol., 2015).

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou také běžným termínem k popisu reaktivních forem odvozených od oxidu dusnatého (Forman a kol., 2015). Mnoho forem volných kyslíkových radikálů je přítomno ve všech organismech včetně superoxidu, peroxidu vodíku, singletového atomu kyslíku a hydroxylových radikálů (Portune, 2008).

2.3.2.1 Superoxid

Superoxid je nejběžnější příklad reaktivní formy kyslíku. Má oxidační i redukční vlastnosti, podléhá dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže se superoxid zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku.

Přestože ve vodném prostředí probíhá reakce vysokou rychlostí, v biologických organismech je ještě urychlována enzymem superoxidodismutázou (Štípek, 2000). Superoxidové radikály mohou způsobovat redukci O₂ pronikáním elektronů proudících přes mitochondriální membrány a rovněž mohou inaktivovat akonitázy (enzymy spojené s cyklem kyseliny citrónové) následované reverzibilními ztrátami železa.

I když je superoxid sám o sobě relativně nereaktivní vůči DNA, je schopen vytvářet více aktivních radikálů peroxydusitanu a oxidu dusnatého, což může vést k buněčné degradaci (Portune, 2008). Superoxid je mimořádně toxický (mnohem více než H₂O₂) a intracelulární koncentrace v pikomolárním rozsahu jsou smrtelné (Miwa a kol., 2008).

2.3.2.2 Hydroxylový radikál

Extrémně reaktivní hydroxylová skupina (OH[•]) může být vytvořena redukcí H₂O₂ redukováným železem ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$) známou jako Fentonova reakce. Další způsob vzniku OH[•] spočívá v interakci superperoxidových radikálů s H₂O₂ za vzniku hydroxylových radikálů, známou jako Haber-Weissova reakce ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^- + \text{O}_2$). Hydroxylové radikály mohou způsobit poškození DNA prostou úpravou purinových a pyrimidinových bází, oligonukleotidovými zlomy (dvouřetězcové zlomy), příčnou vazbou proteinů DNA a chybějícími nukleotidovými bázemi (Portune, 2008). OH[•] reaguje v limitovaných rychlostech difuze téměř s čímkoli,

co nalezne uvnitř buňky. Jeho toxicita je neselektivní a jeho difúzní vzdálenost je velmi krátká.

Vzhledem k tomu, že OH^\bullet rychle a bez rozdílu reaguje, existuje jenom málo antioxidantů, které ho mohou vyloučit, a to jen pokud není přítomen v příliš vysokém množství (Miwa a kol., 2008).

2.3.2.3 Kyselina chlorná

Dalším příkladem je kyselina chlorná (HClO), která je silným oxidantem (Štípek, 2000). Kyselina chlorná je hlavní oxidační činidlo generované neutrofilny. Hemový enzym myeloperoxidáza katalyzuje tvorbu kyseliny chlorné z peroxidu vodíku a chloridu. Myeloperoxidáza se podílí na poškození tkáně, ke kterému dochází u mnohých onemocnění, jenž mají za následek zánět buněk (Pryor, 2001).

V následující rovnici je uvedena tvorba kyseliny chlorné, disociované na chlornanový aniont (OCl^-), katalyzována myeloperoxidázou: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \rightarrow \text{OCl}^- + \text{H}_2\text{O}$ (Kay a Munsch, 2004).

2.3.2.4 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (H_2O_2) není radikálem, nicméně do skupiny ROS nesporně patří, neboť se účastní vzniku radikálů. Reakce samotného peroxidu vodíku s biomolekulami jsou poměrně pomalé, avšak v přítomnosti přechodných kovů (dvojmocné železo Fe^{2+} a jednomocná měď Cu^+) se peroxid vodíku okamžitě redukuje (Štípek, 2000).

Peroxid vodíku může být vytvořen spontánně nebo enzymaticky a to prostřednictvím vznikajících peroxidových radikálů pomocí enzymu superoxidodismutáza. H_2O_2 může inaktivovat glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu v glykolytické cestě a kromě toho je to pouze slabé oxidační a redukční činidlo, které je obecně málo reaktivní. I přesto se zmíněnou reakcí H_2O_2 se superoxidovými radikály (Haber-Weissova reakce) nebo redukcí Fe^{2+} (Fentonova reakce) mohou tvořit velmi reaktivní hydroxylové radikály (Portune, 2008).

2.3.2.5 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je volný radikál, který patří do reaktivních forem dusíku. Přestože je oxid dusnatý velmi jednoduchá molekula, syntetizuje se v organismu poměrně složitým

enzymovým mechanismem. Oxid dusnatý a jeho metabolity jsou za určitých podmínek silně jedovatými látkami (Štípek, 2000).

Oxid dusnatý je tzv. difúzním volným radikálem a také důležitou fyziologickou signální molekulou. Vzhledem ke své malé velikosti a rozpustnosti v tucích je schopen z makrofágů difundovat na ploše přes cca 175 μm . Cytoplazmatická indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (iNOS nebo NOS2) používá v makrofázích L-arginin jako substrát pro výrobu NO a jeho různých oxidačních produktů včetně dusitanu (NO_2^-), oxidu dusičitého (NO_2) a dusičnanů (NO_3).

NO může reagovat s cysteinovými zbytky za vzniku nitrosothiolů nebo se superoxidem vytvářet peroxynitrit (ONOO^-). Tyto sloučeniny jsou známé jako reaktivní formy dusíku a odkazují na oxidačních stavy a adukty dusíkatých produktů iNOS (Parish a Brown, 2009).

2.3.2.6 Oxid dusičitý

Oxid dusičitý (NO_2^\bullet) je za volný radikál považován při napadení nenasycených membránových lipidů, za účelem vytvoření volných radikálů s uhlíkovým středem, které započínají řetězovou reakci peroxidace lipidů (Sen a kol., 2000).

Oxid dusičitý je považován nejen za volný radikál, ale i za poměrně silné oxidační činidlo. Vytváří se, když oxid dusnatý reaguje s kyslíkem ($\text{NO}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^\bullet$). Oxid dusičitý, kromě spolupůsobení s uhličitánovými radikály ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) za vzniku nitračních sloučenin, reaguje s nenasycenými mastnými kyselinami. Reakce probíhá tak, že odstraňuje atom vodíku a vyvolává isomeraci dvojných vazeb v poloze cis v nenasycených mastných kyselinách prostřednictvím reverzibilní adiční reakce. Tyto vlivy poškozují lipidy a v případě, že jsou lipidy součástí buněčné membrány, dochází i k poškození membrány (Gropper a Smith, 2012).

2.4 Antioxidanty

Většina z antioxidantů působí reakcí s volnými radikály (Ötles, 2012). Aerobní organismy mají antioxidační obranné systémy, které se vypořádávají s reaktivními formami kyslíku, jenž jsou produkovány v důsledku aerobní respirace a také oxidací substrátu (Matés a kol., 1999). Pokud dieta obsahuje málo selenu a celkové množství antioxidantů, může tento stav v mnoha případech vyvolávat civilizační choroby (Horký,

2015). Proto jsou antioxidanty považovány za významná nutraceutika z důvodu jejich mnoha zdravotních výhod (Deng a kol., 2011).

Odstraňování superoxidu, peroxidu vodíku a ostatních hydroperoxidů, které jsou relativně pomalu reagující s malými organickými molekulami, se provádí účinně enzymy katalyzující reakce, jež mají rychlostní konstanty 100 000× rychlejší než jejich neenzymatické analogy (Forman a kol., 2015).

Antioxidační obranný systém se vyvíjí na konci těhotenství, a tudíž jsou předčasně narození novorozenci velmi náchylní k oxidačnímu stresu (Zhang a kol., 2015).

2.4.1 Rozdělení antioxidantů

Antioxidanty tvoří nesourodou skupinu látek, a tedy najít výstižné hledisko pro jejich dělení, není snadné. Antioxidanty mohou být rozděleny podle následujících kritérií:

2.4.1.1 Podle možnosti ovlivnění tvorby volných radikálů

Primární antioxidanty zabraňují vzniku volných radikálů, což jsou např. oxidázy. Sekundární antioxidanty redukují již vzniklé volné radikály, kam patří např. superoxiddismutáza. A antioxidanty terciární obnovují nebo se postupně zbavují molekul poškozených působením volných radikálů, např. enzymy, které zabezpečují obnovu poškozené DNA.

2.4.1.2 Podle typu volného radikálu (resp. ROS), na který působí

Superoxiddismutáza, která působí na suproxid. Albumin, cholesterol, dopamin aj., které ovlivňují hydroxylový radikál. Histidin, vitamín C a E aj., jež působí na singletový kyslík. Glutathionperoxidáza a kataláza, které mají vliv na peroxid vodíku. N-methyl-L-arginin s vlivem na oxid dusnatý a antioxidanty sulfasalazin, histidin, methionin aj. ovlivňující kyselinu chlornou.

2.4.1.3 Podle způsobu vstoupení do organismu

Endogenní způsob znamená, že se antioxidanty tvoří v organismu a exogenním způsobem přicházejí antioxidanty zevně. Exogenní antioxidanty mohou být dále rozděleny na přirozené, např. různé vitamíny a umělé, které zahrnují např. běžné léky a patří sem i modifikace přirozených antioxidantů za účelem zlepšení jejich dosažitelnosti nebo zesílení účinnosti (Racek, 2003).

2.4.1.4 Podle molekulové hmotnosti

Vysokomolekulární antioxidanty jsou charakterizované především antioxidačními enzymy, např. kataláza, glutathionperoxidáza a superoxiddismutáza. Nízkomolekulární zahrnují např. glutathion, vitamíny C a E (Mellen a kol., 2011).

2.4.1.5 Podle rozpustnosti ve vodě, nebo v tucích

Hydrofilní antioxidanty jsou rozpustné ve vodě a poměrně rychle se dostanou do organismu, ale neprostupují příliš dobře skrze buněčnou membránu do buněk ani do centrální nervové soustavy. Lipofilní (hydrofóbní) jsou rozpustné v tucích, dostávají se k místu účinku méně rychle, účinkují však v lipoproteidech a membránách. Amfofilní antioxidanty spojují vlastnosti dvou předchozích skupin.

2.4.1.6 Podle lokalizace v buňce nebo mimo buňku

Extracelulární antioxidanty se vyskytují mimo buňku a intracelulární se nacházejí uvnitř buňky. Významem intracelulárních antioxidantů je rozhodující ochrana před volnými radikály.

2.4.1.7 Podle mechanismu účinku

Do této skupiny antioxidantů patří katalyzátory, což jsou enzymy a některé sloučeniny kovů, které napodobují enzymy a v reakci se nespotřebovávají. Dalším příkladem jsou chelatační látky, které váží přechodné kovy jako železo, měď, nikl aj., a tím brání jejich uplatnění v chemické Fentonově reakci. Podobným způsobem působí i některé proteiny, např. transferin, laktoferin aj. Další fungují jako inhibitory enzymů (Racek, 2003).

2.4.2 Příklady antioxidačních látek

Mezi antioxidační látky patří např. vitamín E, což je obecný termín pro skupinu tokoferolů, které jsou lipofilními molekulami. α -tokoferol má největší význam mezi přirozeně se vyskytujícími tokoferoly. Další antioxidační látkou je vitamín C, jenž je na rozdíl od vitamínu E rozpustný ve vodě (Dayan, 2008). Vitamín C je silným antioxidantem, který je schopen reagovat s velkým množstvím biologických oxidantů (Asard a kol., 2004). Význam vitamínu C v prevenci poškození volnými radikály, stárnutí a oxidace bývá někdy podhodnocen. Dostatečný příjem vitamínu C umožňuje regeneraci vitamínu E a dalších antioxidantů v organismu (Hickey a Saul, 2008).

Dalším antioxidantem je glutathion (GSH, L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-L-glycin), což je jeden z nejdůležitějších buněčných antioxidantů a je-li vyčerpán, může mít škodlivý vliv na buňky/tkáně. Mitochondriální zásoba glutathionu je velmi důležitá při ochraně buněk před oxidačním stresem, např. proti většině buněčných reaktivních kyslíkových radikálů, které jsou v mitochondriích generovány (Dukhande, 2009).

2.4.2.1 Glutathion

Glutathion je nejvíce převládající tripeptidový thiol nalezený v lidském buněčném systému. Ze všech thiolů, které jsou obsaženy ve složce krve, tvoří z celkového složení obsah glutathionu 90 % a vzhledem k této mimořádně vysoké koncentraci této látky je třeba brát v úvahu všechny další potenciální thiolové molekuly (McMahon a Gunnlaugsson, 2012).

Glutathion existuje v redoxní rovnováze mezi sulfhydrylovou (redukováná forma, GSH) a disulfidovou (oxidovaná forma, GSSG) formou (Xu a kol., 2016). Glutathion přítomný v jeho redukováné formě, může být rychle oxidován na svou dimerní formu GSSG během odezvy na oxidační stres v buňkách. Z tohoto důvodu se změny ve vnitrobuněčné koncentraci GSH nebo v poměru GSH/GSSG staly klíčovým ukazatelem při sledování celkového zdraví buněk a jejich schopnosti odolávat oxidačnímu poškození (McMahon a Gunnlaugsson, 2012). Tento thiol funguje i jako meziprodukt v boji proti oxidačnímu stresu, udržuje redoxní homeostázu, která je rozhodující pro růst a buněčné funkce a jeho hladina je přímo spojena s některými chorobami a rakovinou (Xu a kol., 2016).

Glutathion vyskytující se v jeho redukováné formě a enzym glutathion reduktáza, který ho vrací z oxidované formy GSSG, jsou konstitutivně aktivní a indukovatelné na oxidační stres (Sochor a kol., 2012). Vyčerpání GSH ve tkáních vede k poškození buněčné obrany proti ROS a může mít za následek peroxidační poškození.

GSH působí jako významný neenzymatický antioxidant vodné fáze a účinkuje i jako esenciální kofaktor pro antioxidantní enzymy, které se účastní buněčných redoxních reakcí. Glutathionreduktáza a glutathionperoxidáza jsou dva nejdůležitější enzymy v GSH-GSSG cyklu a aktivovány mohou být zvýšením vodíku nebo produkcí lipidového peroxidu (Valappil a kol., 2014). Fosfátem aktivovaná mitochondriální glutamináza je klíčový enzym při konverzi glutaminu na glutamát, a tím regulátorem glutathionu (GSH), syntézy a výroby energie (Suzuki a kol., 2010).

2.4.2.2 Vitamín C

Vitamín C přesněji kyselina askorbová (2,3-didehydro-L-gulono-4-lakton) je derivátem monosacharidů a má antioxidační účinky (Kastnerová, 2011). Většina zvířat je schopna vitamín C syntetizovat v játrech a ledvinách. Větší citlivost k nedostatku tohoto vitamínu má člověk a někteří primáti právě kvůli neschopnosti jeho tvorby (Pavlík a Sláma, 2011).

Vitamín C má také antioxidační účinky a ve vysokých koncentracích je schopen redukovat volné radikály. Kyselina askorbová velmi dobře váže kyslík (odevzdává vodík a stává se z ní kyselina dehydroaskorbová), a proto je velice účinným antioxidantem. Podílí se i na antioxidační ochraně buněk, protože dokáže redukovat tokoferolový radikál (Kastnerová, 2011).

Potřeba kyseliny askorbové je druhově rozdílná a závisí také na věku, pohlaví, ročním období, stadiu gravidity aj. Tato potřeba se zvyšuje při stresových situacích. Vitamín C má velký vliv na vývoj a růst kostní tkáně a tvorbu kolagenu. Účastní se detoxikačních procesů a vylučování toxických látek do žluči a moči a je důležitý i v procesu žlučových kyselin. Rovněž stimuluje redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} a jejich vstřebávání přes enterocyty střeva, přenos a zabudování železa do molekuly feritinu. Kyselina askorbová ovlivňuje i absorpci mikroprvků ve dvanáctníku, podporuje rychlost granulocytů, a tím i fagocytózy, čímž se podílí na imunitě organismu.

Nedostatek tohoto vitamínu vyvolává onemocnění zvané skorbut, které je typické opožděným růstem, výskytem poruch ve vývoji zubů a kostní tkáně. Typickým příznakem jsou otoky dásní a uvolňování zubu v zubním lůžku. Při prohlubující se hypovitaminóze může docházet ke krvácení vlásečnic v dutině ústní, nosní, ve střevech, močovém měchýři a ledvinách (Pavlík a Sláma, 2011).

2.4.2.3 Vitamín E

Vitamín E byl objeven a charakterizován jako v tuku rozpustný výživový faktor při studiích reprodukce na potkanech (Eitenmiller a Lee, 2004). Tento vitamín je považován za přirozený antioxidant. Tokoferoly jsou celkem čtyři a značí se řeckou abecedou, jsou to také deriváty chromanu. Největší účinek z nich má alfa-tokoferol, který je v přírodě také nejvíce rozšířen.

Antioxidační účinek vzrůstá od formy alfa- k delta-, což je opačné pořadí než u účinnosti vitaminů. Vitamín E má vysokou afinitu k superoxidovému

a hydroxylovému radikálu a lipidickým peroxidům. Jeho schopností je ochraňovat především membránovou složku fosfolipidů (Kastnerová, 2011).

Tokoferol a další antioxidační složky stravy (vitamín C, karotenoidy, flavonoidy a několik dalších) mají vliv na oxidační stres v jeho různých formách a také na řadu chronických onemocnění, např. chorobné stavy včetně ischemické choroby srdce a rakoviny (Eitenmiller a Lee, 2004).

Vitamín E se účastní oxidoredukčních pochodů a jeho funkce souvisí i s ochranou celistvosti membránových struktur. Nejdůležitější je jeho antioxidační schopnost redukcí volných radikálů, které se podílejí na peroxidaci polynenasycených mastných kyselin buněčných membrán. Funkčně je spjatý s enzymem glutathionperoxidázou, v jejíž chemické struktuře je obsažen právě selen.

Hypovitaminóza vitamínu E při současném deficitu selenu v organismu způsobuje zvýšenou tvorbu toxických peroxidů, což vede k rozpadu buněčných membrán. Následkem toho nastává degenerace kosterní a srdeční svaloviny, jaterního parenchymu a nervové tkáně mozku a cév. U mladých zvířat ve výkrmu dochází k závažnému onemocnění, které se nazývá nutriční svalová dystrofie. V kosterní a srdeční svalovině jsou degenerovaná svalová vlákna nahrazována vazivovou tkání, čímž vznikají ve svalech různě velká ložiska světlého zbarvení. V reprodukčním aparátu dochází k degeneraci epitelu semenotvorných kanálků a porušení placentárního spojení.

Nedostatek vitamínu E také způsobuje exudativní diatézu projevující se vlivem zvýšené propustnosti cév a červenozelenými otoky podkožního vaziva (Pavlík a Sláma, 2011). Vitamín E částečně nahrazuje selen a pomáhá tělu jím šetřit (Kastnerová, 2011).

2.4.3 Enzymy s antioxidačním účinkem

Za účelem ochrany proti poškození, jenž je vyvolané oxidačním stresem vyskytujícím se s nadměrnými hodnotami ROS, vyvinuly aerobní organismy enzymatické [superoxiddismutáza (SOD), kataláza (CAT) a glutathionperoxidáza (GPx)] a neenzymatické [kyselina askorbová, β -karoten, glutathion (GSH), α -tokoferol, atd.] antioxidační obranné systémy (Bathige a kol., 2015). Antioxidační enzymy mají funkci zabránit peroxidačním škodám (Charles, 2012).

Biologické funkce selenu v organismech jsou zprostředkovány různými selenoproteiny. Některé selenoproteiny mají enzymatické funkce (glutathionperoxidáza, atd.) a jsou velmi důležité pro hlavní biologické funkce: antioxidační aktivita, funkce

štítné žlázy, imunita, prevence rakoviny, zdravotní stav mléčné žlázy, rozmnožování a další (Pavlatá a kol., 2011).

2.4.3.1 Glutathionperoxidáza

Glutathionperoxidáza (GPx) je základním členem antioxidačních systémů živých organismů a může se účastnit imunitní obrany proti invazi bakterií (Bathige a kol., 2015). GPx zahrnuje důležitou skupinu redoxně aktivních proteinů s různými funkcemi včetně antioxidační ochrany a signalizace.

GPx byla původně identifikována v savčích buňkách o nízké molekulové hmotnosti nehemové peroxidázy. Peroxidáza katalyzuje glutathion-dependentní detoxikaci cytotoxických ROS a RNS s vysokou účinností. Následně bylo rozhodnuto, že tyto enzymy obsahují vysoce reaktivní selenocystein (SeCys) v jejich aktivních místech, zatímco homologní GPx typu proteinů většinou v nižších organismech, mají pravidelně méně aktivní cystein (Cys) v jejich aktivních místech. Vzhledem k vysoké reaktivitě selenoproteinů je argumentováno, že jejich buněčná funkce spočívá v buněčné antioxidační obraně. (Haselton a kol., 2015).

Glutathionperoxidáza závislá na selenu (SeGPx) je ve velké míře studovaný enzym, který detoxikuje organické peroxidy vodíku a poskytuje buňkám nebo extracelulárním tekutinám antioxidační účinek (Dias a kol., 2016). Selen je součástí enzymu glutathionperoxidázy, která je také u zvířat jedním z nejdůležitějších antioxidantů a rovněž je indikátorem oxidačního stresu (Horký a kol. 2012). U GPx bylo prokázáno, že hraje významnou roli v antioxidačním enzymovém obranném systému mužského reprodukčního traktu i u různých druhů zvířat (Koziorowska-Gilun a kol., 2015).

Nerovnováha mezi reaktivními kyslíkatými částicemi a celkovou antioxidační kapacitou může způsobit až mužskou neplodnost. Selen jako součást glutathionperoxidázy chrání spermatozoa, spermatogonie a spermie proti volným kyslíkovým radikálům, kromě toho hraje klíčovou úlohu v průběhu procesu spermatogeneze. Z toho důvodu je selen nepostradatelný pro spermie, protože jim poskytuje životaschopnost, pohyblivost, ale vůbec celkovou plodnost samců (Horký a kol. 2012).

Glutathionperoxidáza spolupracuje v buňce s glutathionem, který se v buňkách nachází v relativně velké koncentraci. Substrátem pro glutathionperoxidázu je peroxid vodíku anebo organický hydroperoxid. Předpokládá se že glutathion redukuje selen

v glutathionperoxidáze a tato redukováaná forma enzymu potom katalyzuje rozklad peroxidu vodíku (Prousek, 2005). Peroxid vodíku je tímto enzymem přeměňován na vodu a molekulární kyslík (Horký, 2015).

Antioxidační aktivita glutathionperoxidázy dále zahrnuje redukci lipidových hydrogenperoxidů a udržování normální propustnosti membrány (Valappil a kol., 2014).

2.4.3.2 Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza (SOD) je důležitý antioxidační enzym, který má schopnost ochraňovat před toxicitou superoxidu. Superoxiddismutázy jsou všudypřítomné složky buněčných antioxidačních systémů (Culotta a kol., 2006).

Tato látka je metaloenzym, který obsahuje v aktivním centru jeden anebo dva různé atomy přechodného kovu v určitém oxidačním stupni. Superoxiddismutáza tvoří několik isoform, které se liší obsahem atomu kovu v aktivním centru, aminokyselinovým složením, počtem podjednotek a jinými vlastnostmi (Prousek, 2005).

SOD je nalezena ve všech živých buňkách a urychluje určité chemické reakce v těle. Superoxidový radikál může způsobit mutace v DNA nebo napadení enzymů, které syntetizují aminokyseliny a jiné důležité molekuly. Z toho důvodu jsou důležité antioxidační obranné mechanismy všech buněk vystavených kyslíku (Valappil a kol., 2014).

Funkcí těchto enzymů je katalyticky přeměnit superoxidové radikály na kyslík a peroxidu vodíku (Abreu a Cabelli, 2010). Tyto enzymy tedy hrají klíčovou roli v metabolizaci $O_2^{\cdot-}$, předcházejí oxidačním řetězovým reakcím, jež způsobují velké škody a zabraňují tvorbě kaskády škodlivých ROS, včetně H_2O_2 , chlornanový aniont (OCl^-), peroxynitritu (ONO_2^-) a hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}). SOD tedy pomáhá odbourávání potenciálně škodlivých kyslíkových molekul v buňkách, což by mohlo zabránit poškození tkání (Valappil a kol., 2014). Aerobní metabolismus poskytuje k dispozici asi $18\times$ více energie z glukózy, než je tomu u glykolýzy, což je možné u velkých a složitých organismů. A proto schopnost využít O_2 představuje rozhodující evoluční výhodu.

Přestože jsme i nyní vybaveni několika superoxiddismutázami a mnoha podpůrnými antioxidačními systémy, způsobují ROS nevyhnutelné škody, které nakonec limitují

naše životy (Miller, 2012). Tyto enzymy chrání redoxní citlivé mechanismy buněk proti poškození katalýzou, dismutací superoxidového aniontu na kyslík a peroxid vodíku (Culotta a kol., 2006). SOD struktury mohou rovněž kontrolovat jejich enzymatickou aktivitu prostřednictvím inhibice produktů. Manipulace úrovněmi inhibice produktů vykazuje potenciál pro vytvoření léčebné formy SOD (Perry a kol., 2010).

2.4.4 Antioxidační metody

Velký počet testů antioxidační aktivity na základě absorpčního spektra byl vyvinut a použit vzhledem k širokému použití spektrofotometru. DPPH, ABTS a další jsou nejrozšířenějšími činidly pro antioxidační metody založené na základě spektrofotometrie. Tato činidla reagují s antioxidanty přímo a mění jejich absorbance (Papadopoulos, 2008).

Antioxidační aktivita může být měřena několika různými způsoby. Nejčastěji používané metody jsou ty, ve kterých zbytek chromogenní sloučeniny slouží k simulaci ROS a RNS. Nutná je přítomnost antioxidantů, které vyvolávají zánik těchto chromogenních radikálů. Aby byla tato metoda účinná, je potřeba získat téměř rovnovážné syntetické radikály, jenž mohou být snadno detekovány pomocí fotometrických fluorimetrických technik.

Přesto jsou používány různé strategie pro kvantifikaci antioxidační aktivity, např. změna barvy nebo inhibiční testy. Pokud jsou chromogenní radikály používané ke stanovení antioxidační aktivity, nejjednodušší je následující postup metody:

1. Chromogenní radikál se ve vhodném médiu rozpustí.
2. Přidá se antioxidant.
3. Fotometricky se změní ztráta chromogenního radikálu sledováním poklesu absorbance ve stanoveném čase.
4. Korelace poklesu zaznamenaná u křivky odezvy na dávku se standardním antioxidantem (např. trolox, kyselina askorbová), což vyjadřuje antioxidační aktivitu jako ekvivalenty standardního antioxidantu. Zavedeným parametrem v této souvislosti je antioxidační kapacita ekvivalentní troloxu – TEAC (Cazes, 2005).

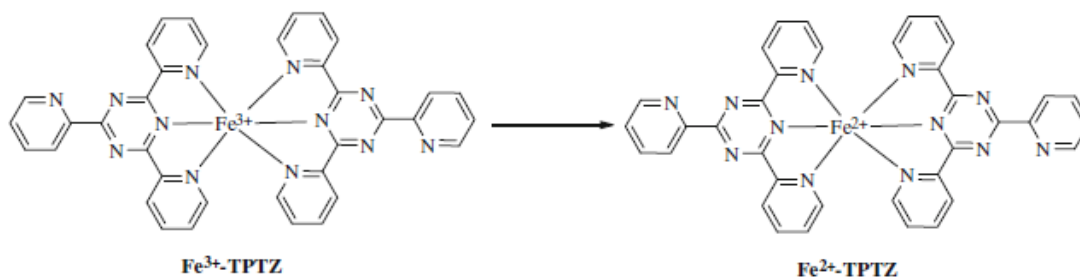
2.4.4.1 Metoda FRAP

FRAP metoda (antioxidační síla založená na redukcí železitých iontů) monitoruje reakci Fe^{2+} s 2,4,6-Tripyridyl-s-triazinem (TPTZ), při které se vytvoří fialovomodré zbarvení s maximem absorpce při 593 nm (Bolanos de la Torre a kol., 2015). Tato metoda, která používá TPTZ jako reakční činidlo, je založena na schopnosti redukce.

Metoda FRAP pomocí antioxidantů přispívá k redukcí železitých iontů (Fe(III))-TPTZ komplexu na železnaté ionty (Fe(II))-TPTZ komplexu. (Fe(II))-TPTZ má intenzivní modrou barvu a může být sledován při 593 nm, a proto může být antioxidační aktivita antioxidantu stanovena měřením absorpce právě při 593 nm (Papadopoulos, 2008). Všechny FRAP testy tedy detekují sloučeniny se standardním redukčním potenciálem a dochází k redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} .

Některé FRAP testy používají jako chromogenní ligand fenantrolin, kyanoželezitan a další látky. Charakteristické znaky testu TPTZ-FRAP byly srovnávány s dalšími celkovými antioxidačními kapacitami (TAC) metod. FRAP testy jsou kompatibilní s automatickými analyzátoři a manuálními formáty testu (Bolanos de la Torre a kol., 2015).

FRAP metoda byla upravena i do formátu pro mikrodestičky, nicméně FRAP metody na bázi mikrotitračních destiček (mFRAP) jsou ovlivněny objemem vzorku a jeho složením (Bolanos de la Torre a kol., 2015). Na Obr. 1 je znázorněna redukční reakce FRAP metody.



Obr. 1 Redukční reakce pro FRAP metodu (Gülçin, 2012).

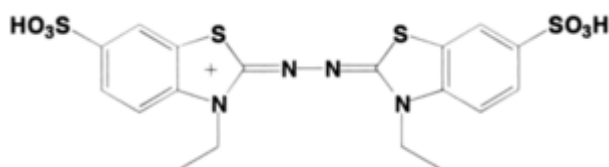
2.4.4.2 Metoda ABTS

Jedním z nejčastěji používaných testů k prověření antiradikálových peptidů je metoda ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina). V tomto testu se modrý/zelený radikál $\text{ABTS}^{\bullet+}$ generovaný oxidací ABTS z persíranu draselného

redukuje v přítomnosti antioxidantů a míra odbarvování je stanovena v pevném časovém okamžiku. Při použití této metody pro posouzení aktivity radikálového zachycování peptidů se běžně používá inkubační doba 6–10 minut pro stanovení koncového bodu.

Široce používané standardní antioxidanty jako je kyselina askorbová a trolox jsou schopné přiblížit koncové body během několika sekund, zatímco mnoho jiných sloučenin nedosahuje stabilních koncových bodů, a to i po 60 minutách, např. chlorogenová a kávová kyselina a kvercetin (Zheng a kol., 2016).

Stanovení antioxidantní aktivity, která využívá ABTS se nazývá metoda TEAC. V testu TEAC se ABTS převede na barevný radikálový kationt (ABTS^{++}) buď chemickou, nebo elektrochemickou oxidací a poté se smísí se vzorkem. Absorbance ABTS^{++} se snižuje spolu s vyplavováním ABTS^{++} pomocí antioxidantů obsažených ve vzorku. Antioxidantní aktivita se vypočítá z poklesu absorbance při 734 nm z kalibrátoru a vyjadřuje se jako ekvivalenty kalibrátoru. ABTS^{++} byl vytvořen pomocí online elektrochemické oxidace ABTS v průtočném elektrolyzáru. Na Obr. 2 je znázorněn strukturní vzorec barevného radikálu ABTS^{++} .



Obr. 2 Strukturní vzorec barevného radikálu ABTS^{++} (Papadopoulos, 2008).

2.4.4.3 Metoda DPPH

DPPH je zkratka označující 2,2-difenylypikrylhydrazyl (volný radikál), který je stabilní a má tmavě fialovou barvou. DPPH antioxidantní metoda spočívá v reakci s dalšími radikály, elektrony nebo atomy vodíku, což vede ke ztrátě barvy při 517 nm a ztrátě signálu volných radikálů v elektronové paramagnetické rezonanci.

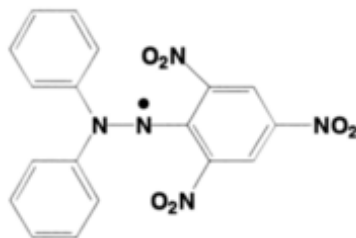
Na rozdíl od ABTS^{++} rozpustného ve vodě je DPPH hydrofobní, takže jeho reakce musí být spuštěna v organických rozpouštědlech. DPPH reakce jsou většinou přisuzované reakcím v silných rozpouštědlech vázaných vodíkovým můstkem, jako je např. methanol, který zabraňuje uvolňování vodíkových atomů. Sloučeniny, které

reagují rychle (dominantní přenos elektronů), jsou kyselina askorbová a jednoduché fenoly, jenž nemají žádné kruhové adiční sloučeniny.

Reakce probíhá pozvolna s přidavkem kyselých skupin nebo jiných postranních řetězců k aromatickým kruhům, kde jsou některé silou působící účinky kruhových adičních sloučenin v rámci fenolových skupin. Vlivy prostorové inhibice na DPPH jsou projeveny poměrně výrazně na počátečních pozicích, jako funkce antioxidační koncentrace. DPPH reakce jsou velmi citlivé na reakční prostředí, tj. vodu a rozpouštědlo (ještě více než ABTS⁺), pH, kyslík a světelnou expozici.

Přítomnost obou elektronových a vodíkových atomových mechanismů přenosu je patrné zejména v proměnlivosti reakcí DPPH s rozpouštědlem. Methanol, jako rozpouštědlo, se používá nejčastěji pro stanovení DPPH, protože atomy vodíku váže silně. Voda narušuje navázání a usnadňuje přenos atomu vodíku, a tedy pokud se přidá k reakční směsi, všechny testované sloučeniny se schopností přenosu vodíkového atomu zvýší rychlost reakce. Podobně přenos elektronů je závislý na pH, zvýšení stupně pH a stupně ionizace (Schaich a kol., 2015).

Ve srovnání s jinými metodami má DPPH test mnoho výhod, jako je např. dobrá stabilita, věrohodná citlivost, jednoduchost a proveditelnost (Deng a kol., 2011). Na Obr. 3 je znázorněn strukturní vzorec barevného radikálu DPPH.



Obr. 3 Strukturní vzorec barevného radikálu DPPH (Papadopoulos, 2008).

2.4.4.4 Metody pro stanovení GSH a GSSG

Mnoho vysokoúčinných kapalinových chromatografií (HPLC metod) pro stanovení GSH a příbuzných sloučenin používá ultrafialové viditelné záření (UV-Vis), detektor diodového pole (DAD), elektrochemický detektor (ECD), hmotnostní spektrometrii (MS) a fluorescenční detektorové (FLD) systémy. HPLC techniky jsou stále častěji používány pro analýzu obsahu GSH a jiných thiolů než jiné metody. HPLC metody jsou rychlé, mají vysokou specificitu a jsou dobře reprodukovatelné (Nollet a Toldrá, 2012).

Přestože je pro měření GSH a GSSG k dispozici několik metod, všechny mohou mít své nevýhody, včetně potřeby vytvářet deriváty, neschopnosti měřit výhodně jak GSH, tak i GSSG a nedostatečnou citlivost umožňující detekci velmi malých vzorků (Armstrong, 2002).

HPLC-UV metoda představuje jednoduché a ověřené postupy detekce pro stanovení GSH a GSSG např. v malých vzorcích plazmy. Tato metoda je rychlá, citlivá a selektivní pro kvantifikaci pikomolových množství GSH a GSSG v plazmě, která nevyžaduje předchozí derivatizaci (Armstrong, 2002). HPLC-UV metoda na bázi DTNB (Ellmanovo činidlo) pro analýzu GSH byla poprvé vyvinuta J. Reevem a J. Kuhlenkampem. Tato metoda byla dále upravena, aby umožnila analyzovat oxidované formy GSH a příbuzných thiolů, zablokovat volné thioly a derivatizovat aminoskupiny. Detekce s kolorimetrickými činidly a UV absorbance nejsou citlivé, ale jsou jednodušší v porovnání s FLD nebo ECD. Tato metoda je široce používaná pro stanovení GSH i GSSG (Nollet a Toldrá, 2012).

HPLC-FLD je nejčastěji používanou metodou pro detekci GSH, GSSG a jiných thiolů, jako je captopril (CAP), Cystein (Cys), homocystein (HCys) a γ -glutamyl cystein (GGC) díky své vysoké citlivosti a přesnosti. Derivatizační činidla použitá v této metodě přednostně reagují s aminovými skupinami. Na druhé straně, je-li použito derivatizační činidlo NPM (N-1-(pyrenyl)maleimid) k měření koncentrací GSH, reaguje se sulfhydrylovou funkční skupinou v GSH během analýzy. HPLC-FLD testy pro GSH a GSSG jsou popsány na základě reakce mezi NPM a sulfhydrylovými skupinami thiolů.

Další metodou stanovení je spektrofotometrická metoda. Jako nejznámější spektrofotometrická metoda pro stanovení GSH byla vyvinuta na základě enzymatické recyklační reakce. Tato metoda, která určuje celkový GSH, je specifitější než spektrofotometrická metoda s Ellmanovým činidlem. Tento způsob známý buď jako spřažená glutathionreduktáza (GR) enzymatického recyklačního testu nebo GSH-recyklační test redukuje GSSG na GSH v přítomnosti DTNB (Ellmanovo činidlo), GR, a NADPH. Reakce s DTNB přináší chromatofor 5-thionitrobenzoát. Změna barvy při 412 nm se používá k analýze GSH. Měření GSSG je možné, pokud je blokována GSH pomocí alkylačního činidla N-ethylmaleimidu (NEM). Tato metoda je stále běžně používána pro přímé stanovení GSH a GSSG. Její jednoduchost, uspokojivá citlivost a náklady jsou důležitými výhodami této metody.

Metoda kapilární elektroforézy je známá jako vysoce účinná a také jako analytická metoda ultra malého objemu. Např. přímé měření GSH a GSSG v červených krvinkách může být dokončeno během <90 sekund.

Některé z nevýhod metody jsou nedostatek automatizace a nemožnost měření GSH vázaného na bílkoviny. GSH a GSSG lze měřit přímo v biologických vzorcích pomocí metody kapilární zónové elektroforézy (CZE). Celkové GSH a Cys byli derivatizovány s 2-chloro-methylchinolinem (CMQT), následovala CZE-UV a měření. Tato metoda je založená na redukci thiolů prostřednictvím redukčního činidla tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP) (Nollet a Toldrá, 2012).

2.5 Nanotechnologie ve výživě

Slovo „nano“ pochází z řeckého jazyka a znamená „trpaslík“, což se odkazuje na rozměr měřítka v rámci rozsahu 10^{-9} m. Nanotechnologie a nanovědy jsou mezivědní výzkumné oblasti, kde se používají pojmy jako fyzika, strojírenství, chemie a biologie ve vzájemné spolupráci k manipulaci záležitostmi na atomární a molekulární úrovni. Poznatky z těchto oborů mají mnoho aplikací v oblasti pokrokových materiálů, biotechnologii a farmacii, dále v elektronice, vědeckých nástrojích a ve výrobních procesech (Pycó, 2012). Budoucnost nanotechnologií bude pravděpodobně pokračovat tímto mezioborovým způsobem (Reisner, 2012).

Velikost je nejdůležitějším parametrem, který je třeba zvážit pro charakterizaci, což je rozhodující pro určení interakce nanočástic s živými systémy. Velikost nanočástic může být regulována pomocí metod použitých k jejich syntéze. Neexistuje jednotný postup pro syntézu nanočástic v laboratorním a průmyslovém měřítku. Tento proces se značně liší v různých výzkumných institucích a v průmyslových laboratořích. Pro stanovení velikosti a jiných fyzikálně-chemických vlastností nanočástic je k dispozici celá řada metod a technologií: dynamický rozptyl světla, mikroskopie atomárních sil, rastrovací elektronová mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie, UV-Vis spektrofotometr a rentgenový difraktometr atd. jsou některé uvedené techniky z běžně používaných pro charakterizaci nanočástic (Dasgupta a kol., 2015).

Jednou z výzev pro nanotechnologie je převést úroveň kontroly do větších stupnic velikostí, např. organická chemie má mimo složení i konformaci molekul (Frewer a kol., 2011). Nejdůležitější přínosy a rizika nanotechnologických aplikací v oblasti potravinářství jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5 Hlavní předpokládané přínosy a rizika nanotechnologických aplikací
v potravinách a souvisejících produktech (Handford a kol., 2014).

| Přínosy | Rizika |
|---|---|
| Nižší používání pesticidů | Potenciálně – lidské zdraví: |
| Lepší sledovatelnost a bezpečnost potravin | 1. Oxidační poškození a zánět gastrointestinálního traktu |
| Snížení obsahu tuku, cukru, soli a konzervačních látek | 2. Akutní toxické reakce: karcinomy, nemoci jater a ledvin |
| Zvýšená nutriční hodnota potraviny/nápoje | Obavy týkající se zdraví a bezpečnosti pracovníků |
| Nové příchutě a textury | Potenciální škodlivé účinky k životnímu prostředí |
| Udržování kvality potravin a čerstvosti | - |
| Hygieničtější zpracování potravin | - |
| Prodloužení skladovatelnosti produktu | - |

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo seznámit se pomocí dostupné české i zahraniční literatury s vlivem selenu jako minerálního prvku na antioxidační potenciál laboratorních potkanů a vypracovat literární rešerši na dané téma.

Podstatou praktických experimentů bylo ověřit vliv přídatku různých forem a hladin selenu na konečnou koncentraci selenu ve tkáních, na antioxidační aktivitu v erytrocytech, plazmě a játrech a na hodnoty GSH a GSSG v krvi, erytrocytech a játrech.

Jako modelová zvířata byla použita skupina samců laboratorního potkana outbredního kmene *Wistar albino*.

4 MATERIÁL A METODIKA

Praktická část diplomové práce se zabývá účinným doplněním selenu do organismu, které vede ke snížení rizika vzniku oxidačního stresu.

Pokus byl uskutečněný v experimentálním zařízení Ústavu výživy zvířat a pícninářství Mendelovy univerzity v Brně (v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb.).

V laboratoři byly monitorovány mikroklimatické podmínky, jenž byly limitovány především teplotou, která byla měřena Dataloggerem S3120. Teplota byla udržována v rozmezí $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Rovněž byla stejným přístrojem monitorována stálá vlhkost vzduchu a udržována byla klimatizační jednotkou na hladině 60 %. Fotoperioda byla řízena uměle dle schématu 12 hodin den a 12 hodin noc o maximální intenzitě 200 lx.

Jako modelová zvířata pro tento experiment byli použiti samci laboratorního potkana outbredního kmene *Wistar albino*. Průměrná hmotnost potkanů na začátku pokusu byla 235 ± 3 gramy. Experimentální sledování trvalo 10 dní. Pokusná zvířata byla ustájena v plastových klecích s rošty. Potkani měli po celou dobu trvání experimentu přístup k vodě a krmivu *ad libitum*.

Potkani byli rozděleni do 3 skupin a v každé skupině bylo ustájeno 6 samců. První skupina (kontrola) potkanů ($n = 6$) sloužila jako kontrolní a dávka selenu zde nebyla navýšena. Druhé skupině (SeN) zvířat ($n = 6$) byl dávkován nanoselen (v množství 0,02 mg selenu/organismus/den). Třetí skupině (SeN-GLU) potkanů ($n = 6$) byl dávkován nanoselen s navázanou glukózou (v množství 0,02 mg selenu/organismus/den a 0,1 mg glukózy/organismus/den).

Pokusným zvířatům byl nanoselen aplikován vždy ve stejnou denní dobu pomocí injekční stříkačky bez jehly takovým způsobem, aby přijímali veškerý obsah beze zbytku. Nanoselen byl podáván ve formě roztoku. Všem skupinám byla zkrmována monodieta (sešrotovaná pšenice) s obsahem selenu 0,025 mg/kg. Velikost selenových částic byla nadefinována.

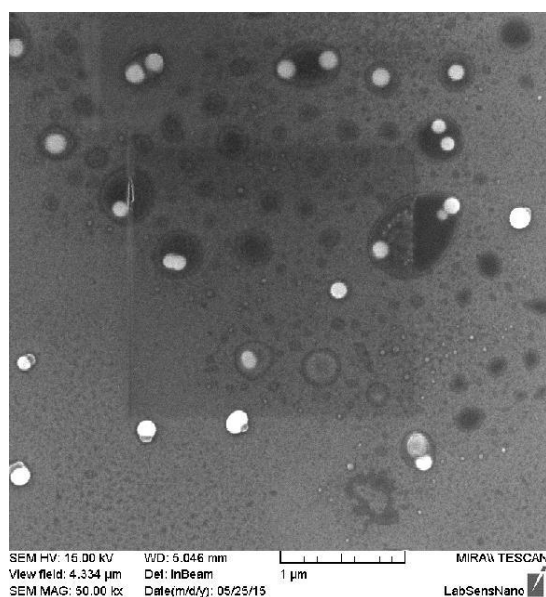
Potkani byli po 10 dnech trvání pokusu usmrceni (2 hodiny od posledního aplikování selenových nanočástic a nanočástic s navázanou glukózou). Ze zvířat byly získány vzorky plné krve, erytrocytů, plazmy, tenkého střeva (dvanáctník v délce cca 4 cm) a jater, které byly ihned po odběru podrobeny patřičným analýzám.

4.1 Výroba selenových nanočástic a selenových nanočástic modifikovaných glukózou

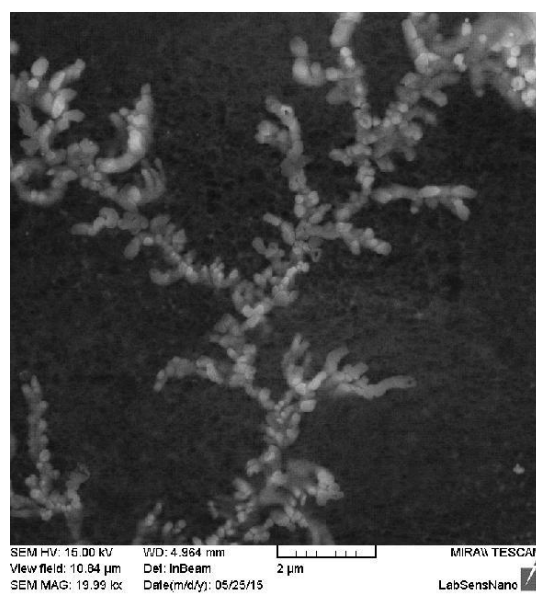
Nanoselen a nanoselen modifikovaný glukózou byly připraveny dle metodiky Chudobová a kol., 2014. Na_2SeO_3 (26,3 mg) byl rozpuštěn ve 40 ml MilliQ vody a bylo upraveno pH na 6,65 pomocí 1 M HCl, následně byl přidán 1 ml cysteinu (1,21 ml/50 ml). Došlo k odbarvení směsi do oranžova a pH se zvýšilo na 7,3.

Na přípravu většího množství selenových nanočástic se použil 10 násobný koncentrát, kde bylo použito 263 mg seleničitanu sodného na 50 ml a 240 μl MPA (3-merkaptopropionová kyselina). Hodnota pH byla upravena kvůli větší stabilitě selenových částic na 9,0. Při výrobě selenových nanočástic s navázanou glukózou se celý proces opakoval s rozdílem, že k výše uvedeným chemikáliím bylo navíc přidáno 500 mg glukózy.

Na Obr. 4 jsou znázorněny nanočástice selenu a na Obr. 5 jsou nanočástice selenu modifikované glukózou.



Obr. 4 Nanočástice selenu



Obr. 5 Nanočástice selenu s glukózou.

4.2 Charakteristika velikosti selenových nanočástic

Průměrná velikost částic a klasifikace velikosti byly stanoveny pomocí techniky dynamického rozptylu světla (Dynamic light scattering – DLS) s přístrojem Malvern Zetasizer (typ Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., kraj Worcester, Velká Británie).

Nanočástice byly rozpuštěny v 1,5 ml destilované vody, aby byla dosažena koncentrace 1 mg/ml. Připravený roztok se umístil do polystyrénové latexové komůrky a provedlo se měření za následujících podmínek: úhel detektoru 173 °, vlnová délka 633 nm, index lomu 0,30, skutečný index lomu 1,33 a teplota 25 °C. Velikost SeN byla stanovena v rozmezí od 33 do 79 nm a velikost SeN-GLU byla v rozmezí od 106 do 531 nm. Rozměry nanočástic syntetizovaného selenu byly ověřeny transmisí elektronovou mikroskopií (TEM) pomocí mikroskopů JEM-2010 a JEOL.

4.3 Příprava plazmy, erytrocytů a jaterních vzorků pro stanovení glutathionu

Vzorek (300 µl) krevní plazmy byl pořízen a smíchán s 300 µl 10% kyseliny trifluoroctové (TFA). Následně se vzorek odstředil na centrifuze (24 000 g, 20 min, 4 °C). Pro další analýzy byl použit supernatant. Po celou dobu byly vzorky uloženy na ledu.

Vzorek erytrocytů (100 mg erytrocytů, čerstvá hmotnost) byl hluboce zmrazen v tekutém dusíku. Potom byl přidán 1,0 ml 0,2 M fosfátového pufru (pH 7,0). Vzorek se 15 minut vortexoval a odstředil (25 000 g, 20 min, 4 °C). Objem 300 µl supernatantu byl pořízen a smíchán s 300 µl 10% kyseliny TFA. Následně se vzorek se odstředil (24 000 g, 20 min, 4 °C). Supernatant byl použit pro další analýzy. Vzorky byly uloženy na ledu po celou dobu trvání experimentu.

Podobný postup byl i u vzorku jater (1,0 g jater, čerstvá hmotnost), který byl hluboce zmrazen v tekutém dusíku. Potom se přidalo 1,0 ml 0,2 M fosfátového pufru (pH 7,0). Vzorek byl homogenizován, 15 minut vortexován a zcentrifugován (25 000 g, 20 min, 4 °C). Objem 300 µl supernatantu byl pořízen a smíchán s 300 µl 10% kyseliny TFA. Následně se vzorek odstředil (24 000 g, 20 min, 4 °C). Pro analýzu byl použit supernatant. Vzorky byly uloženy na ledu po celou dobu pokusu.

4.4 HPLC-ED analýza glutathionu a jeho optimalizace pomocí FIA-ED

Pro optimalizaci stanovení redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu byla použita průtoková injekční analýza s elektrochemickým detekčním systémem (FIA-ED), což sestávalo ze dvou chromatografických čerpadel Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, USA) s pracovním rozsahem 0,001–9,999 ml/min a elektrochemického detektoru CoulArray (model 5600A, ESA, USA). Detektor se skládal z průtokové analytické komory (Model 6210, ESA, USA). Komora obsahovala čtyři analytické články. Jeden analytický článek obsahoval dvě referenční elektrody (vodík-palladium), dvě protielektrody a jednu porézní grafitovou pracovní elektrodu. Elektrochemický detektor se nacházel v kontrolním modulu, který byl s termostatem. Vzorek (20 μ l) byl pomocí injekčního manuálního ventilu (typ Rheodyne, Oak Harbor, WA, USA). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

GSH a GSSG byl stanoven pomocí HPLC-ED. Chromatografický systém sestával ze dvou rozpouštědel dodávaných čerpadly pracujícími v rozmezí 0,001–9,999 ml/min (Model 582 ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), chromatografické kolony Zorbax eclipse AAA C18 (150 \times 4,6; 3,5 μ m velikost částic, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a z elektrochemického detektoru CoulArray (Model 5600A, ESA, Chelmsford, MA, USA). Detektor sestával ze tří průtokových komůrek (Model 6210, ESA). Každá komůrka se skládala ze čtyř pracovních uhlíkových porézních elektrod a každá z nich byla složena z doplňkových suchých referenčních elektrod palladium/vodík. Jak detektor, tak i reakční cívka/kolona byly termostatovány.

Vzorek (20 μ l) byl aplikován pomocí autosampleru (Model 542 HPLC, ESA). V průběhu analýzy byly vzorky udržovány v karuselu při 8 °C. Kolona byla temperována při teplotě 32 °C. Mobilní fáze sestávala z 80 mM kyseliny TFA a methanolu. Podle významu byly sloučeniny rozděleny následujícím lineárním gradientem: 0 \rightarrow 1 min (3% methanol), 1 \rightarrow 2 min (10% methanol), 2 \rightarrow 5 min (30% methanol), 5 \rightarrow 6 min (98% methanol). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, potenciál pracovní elektrody 900 mV. Celkový čas analýzy byl po dobu 20 minut.

4.5 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Metoda Antioxidační síly založené na redukci železitých iontů (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP) je založena na redukci komplexů 2,4,6-tripyridyl-s-triazinu (TPTZ) s železitým hexahydrátem chloridu ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), které byly téměř bezbarvé a v závěru se staly lehce nahnědlými. Po redukci této chemické formy se vytvořili modře zbarvené železnaté komplexy.

Příprava reagensů: *Roztok 1*: 10 mM roztok TPTZ v 40 mM kyseliny chlorovodíkové. *Roztok 2*: 20 mM, roztok hexahydrátu chloridu železitého v ACS čisté vodě. *Roztok 3*: 20 mM acetátového pufru o pH 3,6. Uvedené tři roztoky (TPTZ, FeCl_3 , acetátový pufr) byly smíchány v poměru 1:1:10. Objem 150 μl činidla se vstříkoval do plastové kyvety s následným přidáním 3 μl vzorku. Absorbance byla měřena při 605 nm po dobu 12 min. Rozdíl mezi absorbancí po poslední (12.) minutě a druhé minutě v metodice stanovení byl použit pro výpočet antioxidační aktivity.

4.6 Metoda stanovení antioxidační aktivity volnými radikály (FR)

Tato metoda je založena na schopnosti chlorofylinu (sodno-měďnatá sůl chlorofylu) přijímat a darovat elektrony se stabilní změnou maximální absorpce. Podmínkou uvedeného efektu je alkalické prostředí a přidání katalyzátoru.

Objem 150 μl činidla se vstříkoval do plastové kyvety s následným přidáním vzorku o objemu 6 μl . Absorbance byla měřena při 450 nm v druhé minutě testu a po poslední (12.) minutě. Rozdíl mezi těmito dvěma hodnotami byl považován za výstupní hodnoty.

4.7 Mikrovlnná digesce pro atomovou absorpční spektrometrii (AAS)

Plazma a krev o objemu 10 μl byly pipetovány do digesčních lahvíček a bylo odváženo 10 mg homogenizovaných jater a střeva také do digesčních lahvíček. Jako digesční směs byla použita kyselina dusičná (65%) a peroxid vodíku (30%). Použilo se 500 μl objemu digesční směsi, přičemž poměr mezi kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku byl vždy 7:3 (350 μl HNO_3 a 150 μl H_2O_2).

Vzorky byly digestovány pomocí přístroje Microwave 3000 (Anton Paar GmbH, Rakousko) s rotorem MG-65. Program vždy začínal a končil stejným, deset minut dlouhým, krokem, počínaje výkonem 50 W a konče výkonem 0 W (chlazení). Mikrovlnný výkon byl 100 W v hlavní části programů (po dobu 30 min při 140 °C).

4.8 Stanovení selenu metodou AAS

Selen byl stanoven technologií Agilent 280Z atomového absorpčního spektrometru (Agilent, Germany) s elektrotermickou atomizací. Selenová ultrasenzitivní výbojka s dutou katodou (Agilent, Německo) byla použita jako zdroj radiačního záření (světelný proud 10 mA). Spektrometr byl provozován při 196,0 nm rezonančního obvodu se spektrální šířkou pásma 1,0 nm. Objem vzorku 20 μ l byl nastříknut do grafitové trubičky. Průtok inertního plynu (argon) byl 300 ml/min. Zeemanova korekce pozadí byla použita s intenzitou pole 0,8 T. Selen byl stanoven v přítomnosti chemického modifikátoru palladia.

4.9 Statistická analýza

Data byla statisticky zpracována pomocí programu STATISTICA.CZ, verze 10.0 (Česká republika). Výsledky byly vyjádřeny jako střední hodnoty \pm směrodatná odchylka (Standard Deviation, SD). Statistická významnost byla stanovena zkoumáním základních rozdílů mezi skupinami s použitím Analýzy rozptylu (ANOVA) a *Scheffova testu* pro parametry GSH, GSSG, Se, FR a FRAP. Rozdíly s $P < 0,05$ byly považovány za významné.

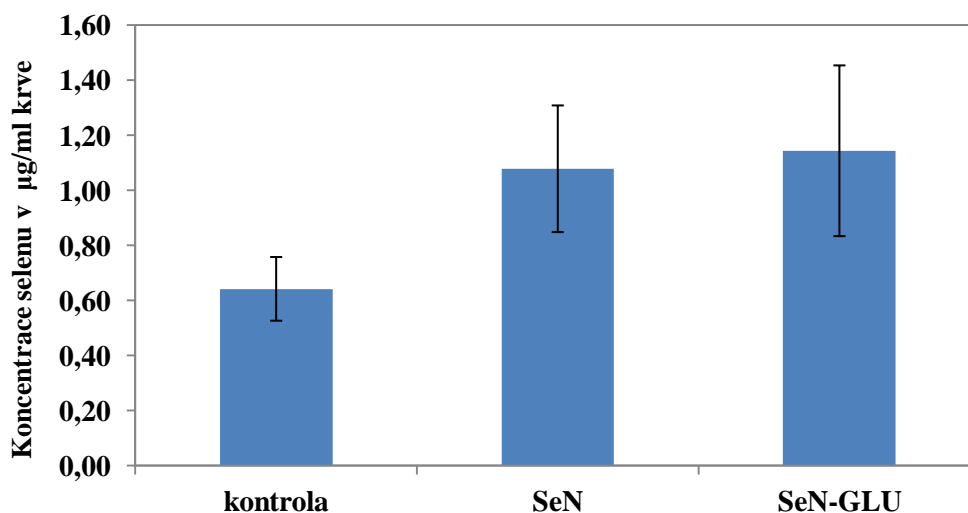
5 VÝSLEDKY

Během experimentu byly pokusným potkanům zkrmovány různé formy nanoselenu v různých hladinách (0 mg, 0,02 mg a 0,02 mg selenu/organismus/den + 0,1 mg glukózy/organismus/den). Během experimentu byla sledována konečná koncentrace selenu ve tkáních (krev, plazma, střevo, játra), antioxidační aktivita v erytrocytech, plazmě a játrech a hodnoty redukovaného a oxidovaného glutathionu.

5.1 Vliv různých forem a hladin selenu na konečnou koncentraci selenu ve tkáních

Během pokusu byla zaznamenávána data z laboratorních rozborů krve, plazmy, jater a střev potkanů ze všech skupin.

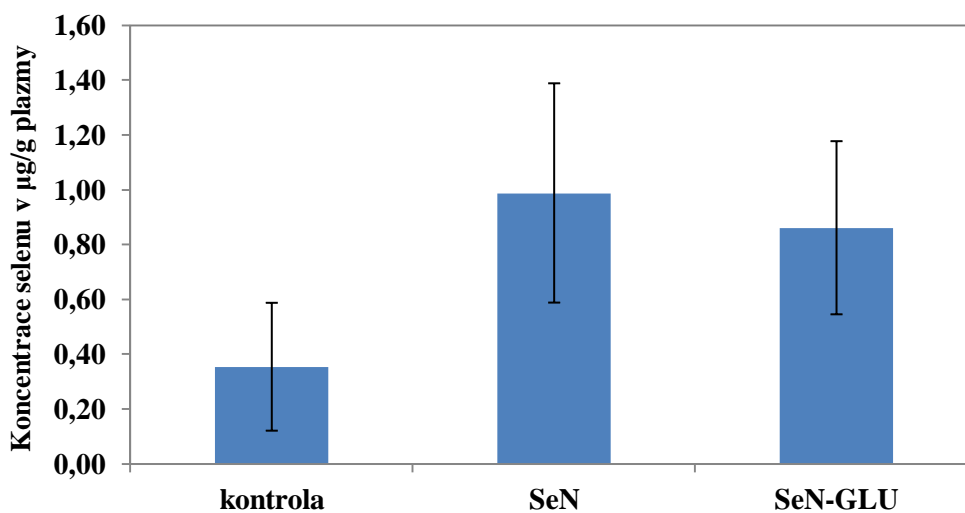
Graf 1 vyobrazuje výsledky koncentrace selenu v krvi u kontrolní skupiny a skupin pokusných. Z tohoto grafu můžeme vypočítat, že u pokusných skupin byla koncentrace selenu v krvi statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) než u skupiny kontrolní. Hodnota koncentrace selenu v krvi u skupiny zkrmované nanoselenem bez navázané glukózy (SeN) byla o 68,8 % vyšší v porovnání s kontrolou a průkazně nejvyšší koncentrace byla u selenových nanočástic s navázanou glukózou (SeN-GLU), kde došlo ke zvýšení koncentrace o 78,1 %.



Graf 1 Vliv SeN a SeN-GLU na koncentraci selenu v krvi.

Graf 2 zobrazuje výsledky koncentrace selenu v plazmě u kontrolní skupiny a skupin pokusných.

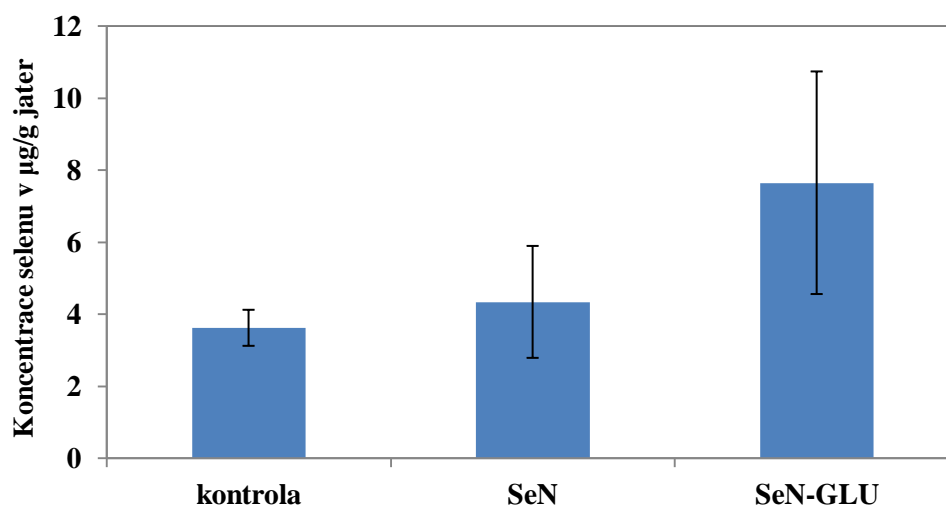
Z tohoto grafu můžeme usoudit, že u pokusných skupin byla koncentrace selenu v plazmě vyšší než u skupiny kontrolní, avšak výsledky se statistickou průkazností jsou pouze u skupiny, které byl aplikován samotný nanoselen. Hodnota koncentrace selenu v plazmě byla stanovena u skupiny, které byl aplikován nanoselen bez glukózy průkazně ($P < 0,05$) nejvyšší v porovnání s kontrolou, a to o 182,9 %. Statisticky neprůkazná byla koncentrace u selenových nanočástic s glukózou, a to s hodnotou o 145,7 % vyšší než byla kontrola.



Graf 2 Vliv SeN a SeN-GLU na koncentraci selenu v plazmě.

Graf 3 udává výsledky koncentrace selenu v játrech u kontrolní skupiny a skupin pokusných.

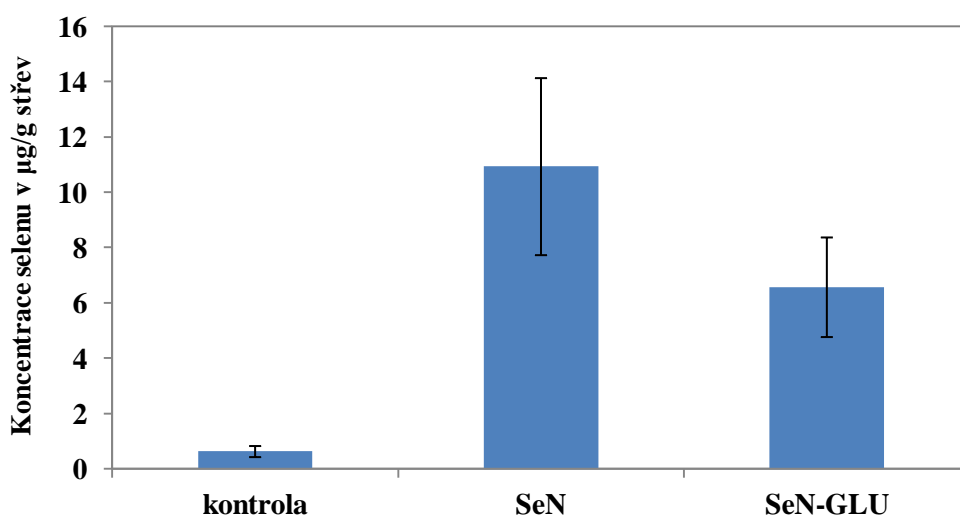
Z tohoto grafu můžeme vyvodit, že u pokusných skupin byla koncentrace selenu v játrech vyšší než u skupiny kontrolní, avšak výsledky jsou statisticky průkazné pouze u skupiny, které byl aplikován nanoselen modifikovaný glukózou. Hodnota koncentrace selenu v játrech u skupiny, které byl aplikován nanoselen bez navázané glukózy byla stanovena o 19,9 % vyšší oproti kontrole a průkazně nejvyšší ($P < 0,05$) koncentrace byla u selenových nanočástic s navázanou glukózou, a to o 111,3 % vyšší v porovnání s kontrolou.



Graf 3 Vliv SeN a SeN-GLU na koncentraci selenu v játrech.

Graf 4 ukazuje výsledky koncentrace selenu ve střevech u kontrolní skupiny a skupin pokusných.

Z tohoto grafu můžeme vyvodit, že u pokusných skupin byla koncentrace selenu ve střevech vyšší, než u skupiny kontrolní a výsledky jsou u obou skupin statisticky průkazné. Hodnota koncentrace selenu ve střevech byla u skupiny, které byl aplikován nanoselen bez navázané glukózy průkazně nejvyšší ($P < 0,05$) a stanovena byla o $10,3 \mu\text{g/g}$ vyšší v porovnání s kontrolou. Průkazná byla i hodnota u selenových nanočástic s navázanou glukózou, a to o $5,94 \mu\text{g/g}$ více než u kontroly.



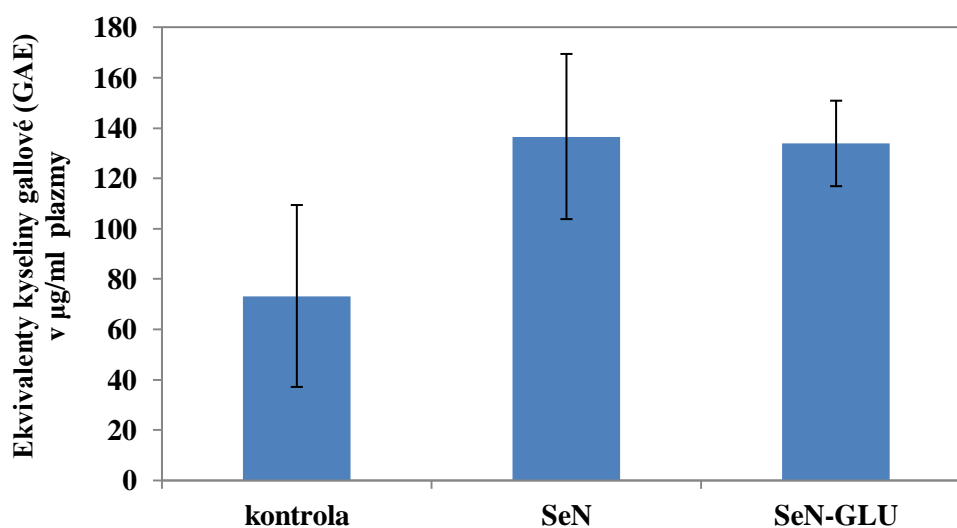
Graf 4 Vliv *SeN* a *SeN-GLU* na koncentraci selenu ve střevech.

5.2 Vliv různých forem a hladin selenu na antioxidační aktivitu

Pro vyhodnocení antioxidační aktivity byly použity metody FR (Free radicals) a FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay).

Graf 5 zobrazuje výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FR v plazmě u kontrolní skupiny a skupin pokusných. Vyjádřena byla jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE) v $\mu\text{g/ml}$ plazmy.

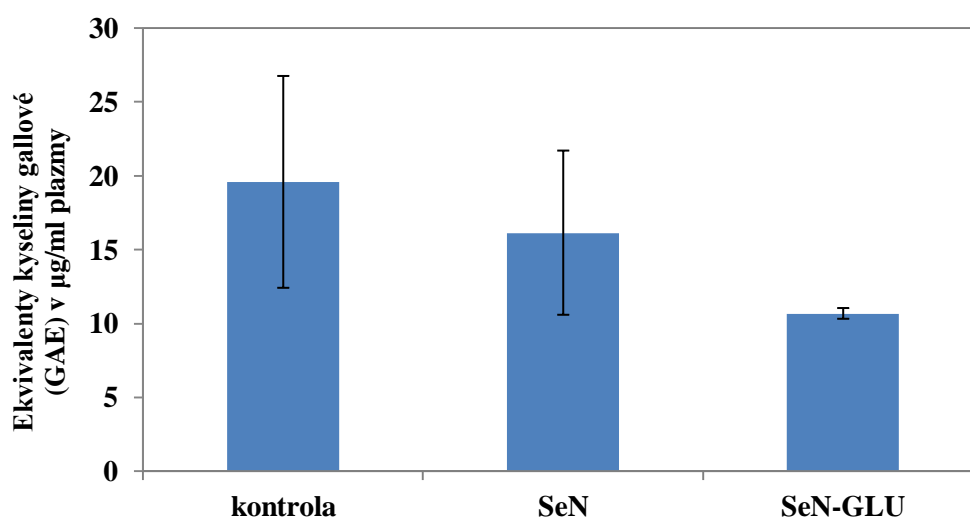
Z tohoto grafu můžeme vypožorovat, že u pokusných skupin byla antioxidační aktivita v plazmě statisticky průkazně ($P < 0,05$) vyšší pouze u pokusné skupiny s nanočásticemi selenu s navázanou glukózou (SeN-GLU) v porovnání se skupinou kontrolní, a to v hodnotě o 83,6 % vyšší. Statisticky neprůkazná byla skupina s navázaným nanoselenem bez glukózy (SeN), kde hodnota dosáhla o 87,7 % více než u kontroly.



Graf 5 Stanovení antioxidační aktivity v plazmě metodou FR.

Graf 6 zobrazuje výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay) v plazmě u kontrolní skupiny a skupin pokusných. Vyjádřena byla rovněž jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE) v $\mu\text{g/ml}$ plazmy.

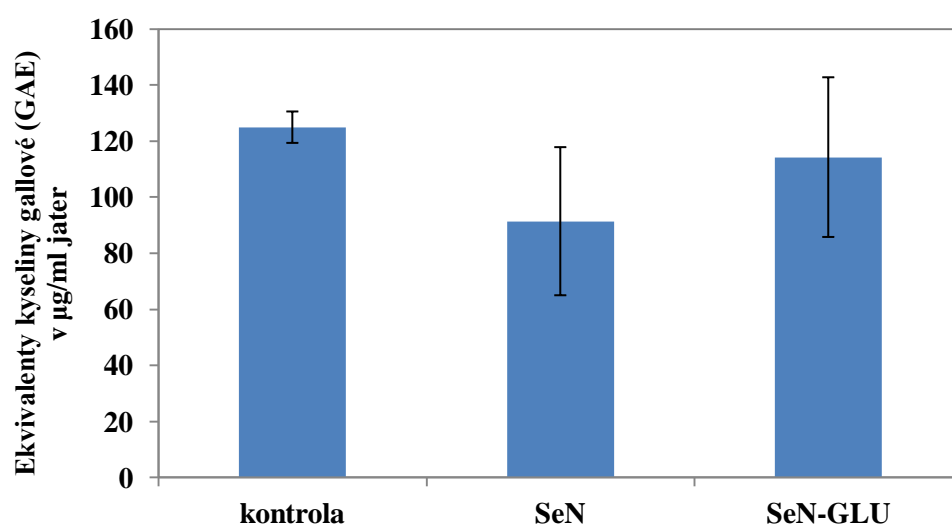
Z tohoto grafu můžeme vypočítat, že u pokusných skupin byla antioxidační aktivita v plazmě statisticky průkazná ($P < 0,05$) pouze u pokusné skupiny s nanočásticemi selenu modifikovaných glukózou (SeN-GLU) v porovnání se skupinou kontrolní, kde došlo ke snížení aktivity o 45,3 %. Ke snížení aktivity došlo neprůkazně i u skupiny SeN, a to o 17,6 % oproti kontrole.



Graf 6 Stanovení antioxidační aktivity v plazmě metodou FRAP.

Graf 7 ukazuje výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FR (Free radicals) v játrech u kontrolní skupiny a skupin pokusných. Vyjádřena byla jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE) v $\mu\text{g/ml}$ jater.

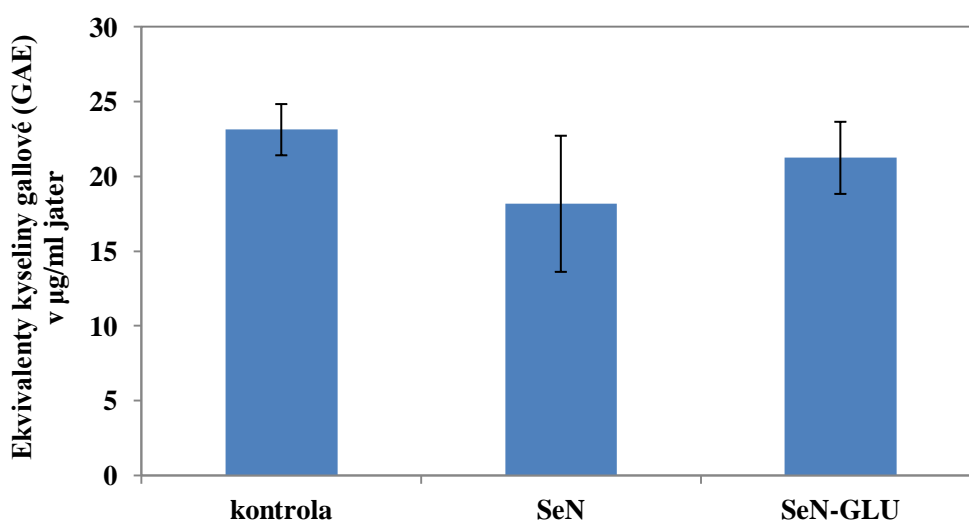
Z tohoto grafu můžeme vypočítat, že u pokusných skupin byla antioxidační aktivita v játrech statisticky průkazná ($P < 0,05$) pouze u pokusné skupiny s nanočásticemi selenu (SeN) v porovnání se skupinou kontrolní, kde došlo ke snížení aktivity o 26,8 %. Ke snížení aktivity došlo neprůkazně i u skupiny SeN-GLU, a to o 8,5 % oproti kontrole.



Graf 7 Stanovení antioxidační aktivity v játrech metodou FR.

Graf 8 zobrazuje výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay) v játrech u kontrolní skupiny a skupin pokusných. Vyjádření jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE) v $\mu\text{g/ml}$ jater

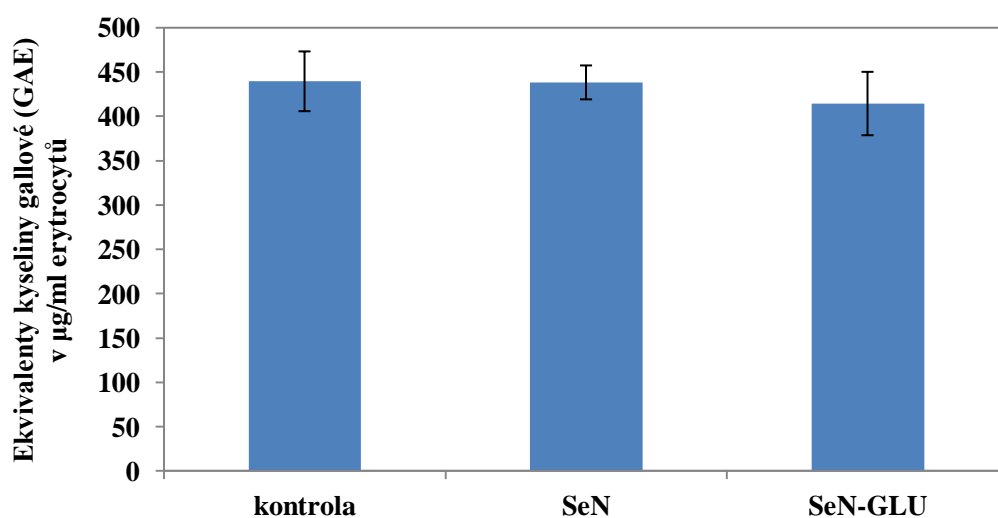
Z tohoto grafu je patrné, že u pokusných skupin nebyla antioxidační aktivita v játrech statisticky průkazná. U pokusné skupiny s nanoselenem bez glukózy v porovnání se skupinou kontrolní došlo tedy neprůkazně ke snížení aktivity o 21,4 %. Ke snížení aktivity došlo neprůkazně i u skupiny SeN-GLU, a to o 8,2 % oproti kontrole.



Graf 8 Stanovení antioxidační aktivity v játrech metodou FRAP.

Graf 9 zobrazuje výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FR v erythrocytech u kontrolní skupiny a skupin pokusných. Vyjádřeno jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE) v $\mu\text{g/ml}$ erythrocytů.

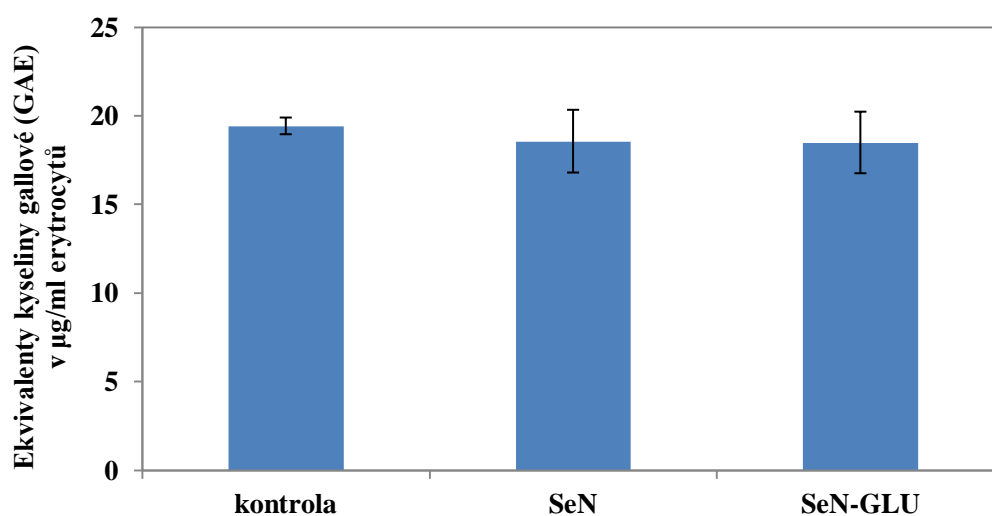
Z uvedeného grafu je patrné, že u pokusných skupin nebyla antioxidační aktivita v erythrocytech statisticky průkazná. U pokusné skupiny s nanoselenem bez glukózy v porovnání se skupinou kontrolní došlo neprůkazně ke snížení aktivity o 0,3 %. Ke snížení aktivity došlo neprůkazně i u skupiny SeN-GLU, a to o 5,7 % oproti kontrole.



Graf 9 Stanovení antioxidační aktivity v erythrocytech metodou FR.

Graf 10 zobrazuje výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP v erythrocytech u kontrolní skupiny a skupin pokusných. Vyjádřeno jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE) v $\mu\text{g/ml}$ erythrocytů.

Z uvedeného grafu vyplývá, že u pokusných skupin nebyla antioxidační aktivita v erythrocytech statisticky průkazná. U pokusné skupiny s nanočásticemi selenu bez glukózy v porovnání se skupinou kontrolní došlo neprůkazně ke snížení aktivity o 4,5 %. Ke snížení aktivity došlo neprůkazně i u skupiny s nanočásticemi selenu modifikovaných glukózou, a to o 4,8 % v porovnání s kontrolou.

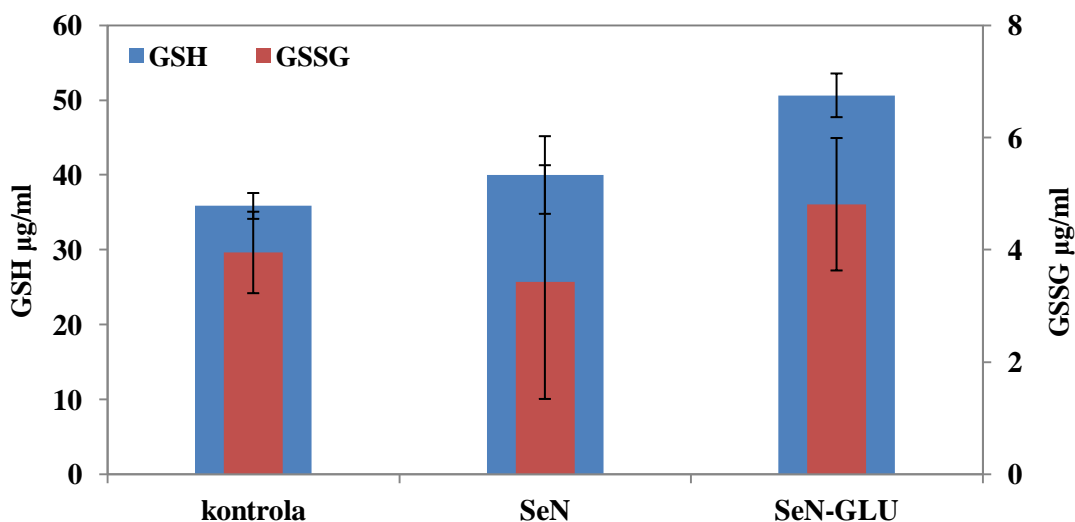


Graf 10 Stanovení antioxidační aktivity v erythrocytech metodou FRAP.

5.3 Vliv různých forem a hladin selenu na úroveň GSH a GSSG

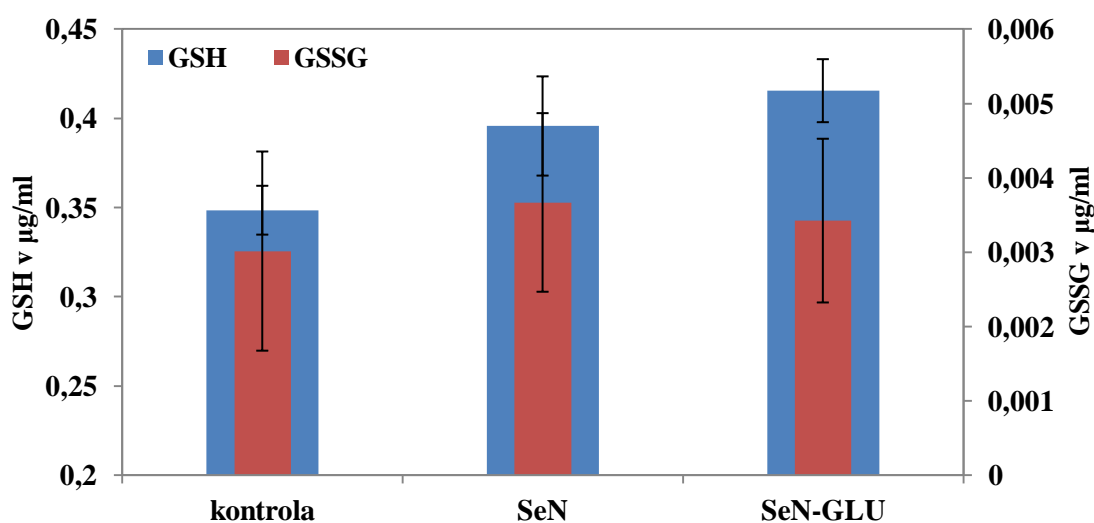
Dalším sledovaným antioxidačním kritériem, jenž má přímou souvislost se selenem a udává antioxidační potenciál organismu jsou hladiny hodnot GSH a GSSG.

Graf 11 zobrazuje účinek SeN a SeN-GLU na úroveň hodnot GSH a GSSG naměřených v krvi. U stanovení GSH byla statisticky průkazná ($P < 0,05$) pouze hodnota ve skupině SeN-GLU v porovnání s kontrolou, kdy úroveň GSH dosáhla hodnoty o 41,2 % vyšší. Hodnota ve skupině SeN nebyla průkazná a bylo pozorováno zvýšení o 11,5 %. Ve stanovení GSSG nebyla průkazná žádná naměřená hodnota. GSSG bylo sníženo ve skupině SeN o 13,4 % a v SeN-GLU bylo zvýšeno o 21,7 %.



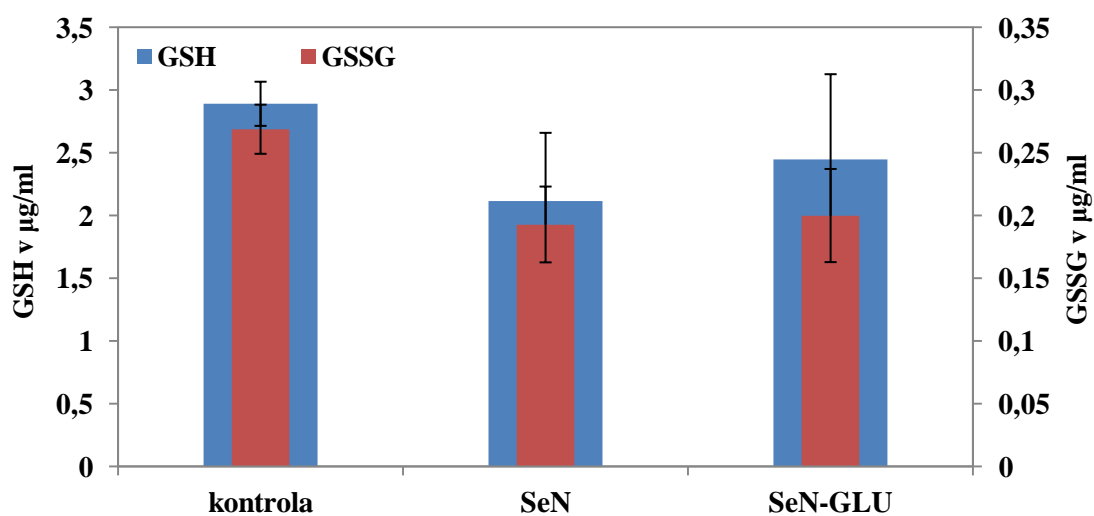
Graf 11 Účinek SeN a SeN-GLU na úroveň GSH a GSSG v krvi.

Graf 12 zobrazuje účinek SeN a SeN-GLU na úroveň hodnot GSH a GSSG naměřených v erytrocytech. U stanovení GSH byly statisticky průkazné ($P < 0,05$) hodnoty v obou skupinách. Ve skupině SeN v porovnání s kontrolou došlo ke zvýšení úrovně GSH o 13,5 %. Hodnota ve skupině SeN-GLU byla pozorována o 19,2 % vyšší. Ve stanovení GSSG nebyly průkazné hodnoty ani u jedné skupiny. GSSG bylo zvýšeno ve skupině SeN o 21,7 % ve srovnání s kontrolou a v SeN-GLU skupině bylo GSSG také zvýšeno, a to o 13,6 %.



Graf 12 Účinek SeN a SeN-GLU na úroveň GSH a GSSG v erytrocytech.

Graf 13 zobrazuje účinek SeN a SeN-GLU na úroveň hodnot GSH a GSSG naměřených v játrech. U stanovení GSH byla statisticky průkazná ($P < 0,05$) pouze hodnota ve skupině SeN v porovnání s kontrolou, kdy úroveň GSH dosáhla hodnoty o 26,8 % nižší. Hodnota ve skupině SeN-GLU nebyla průkazná a bylo pozorováno snížení o 15,3 %. Ve stanovení GSSG byly průkazné ($P < 0,05$) hodnoty u obou skupin. GSSG bylo sníženo ve skupině SeN o 28,2 % ve srovnání s kontrolou a v SeN-GLU bylo také GSSG sníženo, a to o 25,6 %.



Graf 13 Účinek SeN a SeN-GLU na úroveň GSH a GSSG v játrech.

6 DISKUZE

Vliv aplikace nanočástic selenu na koncentrace selenu v jednotlivých tkáních

Mohapatra a kol. (2014) ve studii účinků suplementace nanoselenu na výkon slepic nosného typu hodnotili vliv nanoselenu a seleničitanu sodného na antioxidační aktivitu a obsah selenu ve tkáních nosnic během fáze jejich chovu (po 9–20 týdnech) v šesti ošetřovaných skupinách. Nosnice, které byly krmeny jak nanoselenem, tak i seleničitanem sodným vykazovaly statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah selenu v různých tkáních (např. v prsním svalu, játrech, ledvinách, krevním séru). Nicméně, obsah selenu v játrech a prsních svalech, byl významně vyšší ($P < 0,05$) ve skupině, kde byl podáván samotný nanoselen oproti kontrole i vůči seleničitanu sodnému. Po podávání nanoselenu v dietě došlo ke zvýšení selenu v játrech o 194,1 % oproti kontrole. Doplněk stravy v podobě nanoselenu zlepšil antioxidační stav a ukládání selenu ve tkáních slepic nosného typu.

V našem experimentu bylo zvýšení selenu v játrech průkazné ($P < 0,05$) pouze u skupiny, které byl aplikován nanoselen modifikovaný glukózou, kde koncentrace byla stanovena o 111,3 % vyšší v porovnání s kontrolou. Hodnota koncentrace selenu v játrech u skupiny, které byl aplikován pouze nanoselen byla neprůkazně stanovena o 19,9 % vyšší oproti kontrole.

Wang a kol. (2011) zkoumali ve studii účinky suplementace organickou (selenomethionin) a anorganickou formou selenu (seleničitan sodný) na distribuci selenu a antioxidační status u brojlerů. Kontrolní skupina brojlerů byla zkrmována krmnou směsí bez přídavku selenu (obsah selenu 0,04 mg/kg krmné směsi). Pokusné skupiny brojlerů byly zkrmovány krmivem obohaceným organickou nebo anorganickou formou selenu, v obou skupinách v dávce 0,15 mg/kg krmné směsi. Doba trvání pokusu byla 42 dnů a za tuto dobu bylo zjištěno, že suplementace selenem zvýšila koncentraci selenu v krevním séru a ve zkoumaných orgánech. Organická forma selenu působila příznivěji než forma anorganická.

V našem stanovení byla u obou pokusných skupin koncentrace selenu v krvi statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) než u skupiny kontrolní. U obou pokusných skupin byla koncentrace selenu v plazmě vyšší než u skupiny kontrolní, avšak výsledky se statistickou průkazností byly pouze u skupiny, které byl aplikován samotný nanoselen. U pokusných skupin byla koncentrace selenu v játrech vyšší, než u skupiny kontrolní, avšak výsledky byly statisticky průkazné pouze u skupiny, které byl aplikován

nanoselen modifikovaný glukózou. V pokusných skupinách byla koncentrace selenu ve střevech mnohem vyšší, než u skupiny kontrolní a výsledky byly u obou skupin statisticky průkazné.

Mahn a kol. (2009) sledovali vliv dietní suplementace na potkanech buď se selenomethylselenocysteinem nebo seleničitanem sodným na hodnoty plazmy. Dvě pokusné skupiny sestávaly z šesti potkanů, které byly krmeny základní dietou doplněnou buď selenomethylselenocysteinem nebo seleničitanem sodným s obsahem selenu 1,9 mg/g po dobu deseti týdnů. Kontrolní skupina byla krmena dietou, která obsahovala doporučenou dávku selenu (0,15 mg/g diety).

Celková koncentrace selenu byla stanovena ve vzorcích plazmy s cílem zjistit vliv různých forem selenu. Koncentrace selenu v plazmě byla mírně vyšší u zvířat krměných stravou doplněnou selenem ve srovnání s kontrolní skupinou. Nicméně, nebyly zde stanoveny žádné statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a experimentální skupinou ($P > 0,05$). Kromě toho nebyly pozorovány významné rozdíly v plazmatické koncentraci selenu mezi zvířaty krměnými selenomethylselenocysteinem nebo seleničitanem sodným ($P > 0,05$).

Oproti tomu v našem pokusu byla u pokusných skupin koncentrace selenu v plazmě vyšší, než u skupiny kontrolní, avšak výsledky se statistickou průkazností byly stanovené pouze u skupiny, které byl aplikován samotný nanoselen.

Vliv nanoselenu na antioxidační aktivitu ve tkáních potkanů

Janaszewska a Bartosz (2009) ve studii použili tři spektrofotometrické metody pro stanovení antioxidační kapacity, a to metodu založenou na vychytávání volných radikálů 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH), dále FRAP a metodu založenou na redukci volného radikálu 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolinsulfonát). Porovnání bylo se standardními antioxidanty (askorbát, glutathion a trolox) a lidskou krevní plazmou.

Byly zjištěny různé aktivity standardních antioxidantů v různých testech a glutathion vykazoval nízkou reaktivitu v metodě FRAP. Kinetická měření ukázala, že snížení indikátorů zejména krevní plazmy, nemusí být úplné v doporučených dobách metod a doba měření je důležitý parametr při porovnání výsledků.

V našem pokusu jsme stanovovali antioxidační aktivitu pomocí metod FR a FRAP v obou případech po dobu 12 minut. Pro vyhodnocení byly použity ekvivalenty kyseliny gallové v $\mu\text{g/ml}$.

Stanovení antioxidační aktivity metodou FR a FRAP v plazmě bylo provedeno u kontrolní skupiny a skupin pokusných. U pokusných skupin byla antioxidační aktivita v plazmě statisticky průkazná ($P < 0,05$) pouze u pokusné skupiny, kde působily nanočástice selenu s navázanou glukózou v porovnání se skupinou kontrolní. Avšak v metodě FR došlo ke zvýšení a v metodě ke snížení aktivity. Neprůkazné stanovení bylo ve skupině s navázaným nanoselenem, kde u obou metod došlo ke snížení aktivity.

Další studii provedli Fortier a kol. (2012) s cílem zkoumat schopnosti selenových nanočástic na zvýšení testikulární antioxidační aktivity sameců potkanů a porovnání účinku nanoselenu a selenu. Výsledky ukázaly, že nanoselen měl silné účinky na zvýšení antioxidační kapacity zvýšením koncentrace redukovaného glutathionu (GSH) a celkové antioxidační kapacity. Došlo k výraznému zvýšení reprodukční schopnosti potkanů. Z výsledků bylo zjištěno, že nanoselen zlepšil zjišťované parametry ve srovnání s běžným selenem.

Ahmed Abdelaleem a kol. (2016) zkoumali ve studii ochrannou roli extraktu selenových nanočástic ve směsi s hroznovými jádérky, kde bylo zjišťováno zmírnění biomarkerů oxidačního stresu vyvolaného γ zářením u diabetických potkanů.

Čtyřicet osm potkanů bylo náhodně rozdělených do 5 experimentálních skupin: normální, s diabetem, ozařované, diabetické ozařované, diabetické ošetřené nanočásticemi selenu (1 mg) po dobu 14 dnů s následným γ ozářením. Výsledky studie ukázaly, že u potkanů vystavených γ záření došlo k poklesu hladiny celkové antioxidační kapacity. Potkani s diabetem, ošetřeni nanočásticemi selenu před γ ozářením, vykazovali výrazné zlepšení ve všech testovaných biochemických parametrech. Studie ukázala, že nanočástice selenu mají antioxidační aktivitu způsobenou redukcí biomarkerů oxidačního stresu.

Shi a kol. (2011) se ve své studii zabývali studiem vlivu selenu ve formě anorganické, organické a nanoselenu na koncentraci selenu a antioxidační status u rostoucích kozlů. Celkem 40 odstavených černých kozlů bylo náhodně rozděleno do čtyř stejných skupin a s ohledem na základní stravu buďto nebyli suplementováni, nebo jim byl podáván přídavek selenu v množství 0,3 mg/kg krmné směsi ve formě seleničitanu sodného, selenových kvasinek nebo nanoselenových částic po dobu 90 dnů experimentu. Krevní sérum, krev a další tkáně byly odebírány za účelem stanovení antioxidační aktivity a pro analýzu obsahu selenu.

Na konci suplementace bylo pět samců v každé skupině usmrceno a byly odebrány vzorky srdce, jater, plic a ledvin pro stanovení obsahu selenu. Krevní, sérové a tkáňové koncentrace selenu a antioxidační aktivita v séru byly ovlivněny dietní suplementací selenu. Sérová antioxidační aktivita ve skupině s nanočásticemi selenu byla vyšší ($P < 0,05$) oproti kontrole a rovněž byla vyšší i v porovnání se skupinami, kde byl přírůstek seleničitanu sodného a selenových kvasinek. Obsah selenu v krvi, séru, játrech a ledvinách ve skupině s nanoselenem byl vyšší nejen ve srovnání s kontrolou, ale i ve skupině se seleničitanem sodným nebo se selenovými kvasinkami ($P < 0,05$).

Studie nastínila, že suplementace selenem může zlepšovat antioxidační status v krevním séru a koncentraci selenu v krvi a tkáních u rostoucích kozlů. Dietní suplementace nanoselenu byly účinnější ve srovnání s anorganickou nebo organickou formou selenu.

V našem experimentu jsme sledovali antioxidační aktivitu v plazmě a erytrocytech, kde jsme dospěli k průkazně ($P < 0,05$) vyšším výsledkům ve skupině s aplikovaným nanoselenem modifikovaným glukózou, a to pouze v plazmě. Doba expozice byla v našem pokusu relativně krátká (10 dnů) pro projevení úplné účinnosti selenu.

Obsah selenu v plazmě jsme zjistili průkazně ($P < 0,05$) vyšší ve skupině se samotným nanoselenem, v játrech došlo k průkaznému zvýšení ve skupině s nanoselenem modifikovaným glukózou a v krvi byly hodnoty selenu u obou skupin průkazně vyšší v porovnání s kontrolou.

Vliv nanočástic selenu na hodnoty GSH a GSSG ve tkáních

Vliv selenu na hodnoty GSH sledovali ve své studii Akil a kol. (2011). Tato studie měla za cíl vyhodnotit účinek suplementace selenu u potkanů vystavených akutnímu plaveckému výkonu.

Bylo použito 32 dospělých samců potkana typu *Sprague-Dawley*, kteří byli rozděleni do čtyř skupin. Skupina 1 byla kontrolní, ve skupině 2 byl doplňován selen, skupina 3 byla kontrolní (plavecká) a ve skupině 4 (plavecká) byl také doplněn selen. Zvířatům ve skupinách 2 a 4 bylo aplikováno 6 mg/kg/den seleničitanu sodného po dobu 4 týdnů. Vzorky krve odebrané ze zvířat dekapitací byly analyzovány z hlediska erytrocytů se zaměřením na redukovaný glutathion (GSH). Ve studii byly nejvyšší hodnoty GSH získány ve skupině 4 ($P < 0,001$). Výsledky této studie ukazují, že zvýšená produkce volných radikálů v důsledku akutního plaveckého výkonu u potkanů

může být kompenzována doplněním selenu. Suplementace selenem může být důležitá v tom, že podporuje antioxidační systém při tělesné aktivitě.

V našem experimentu byl obdobně účinek SeN a SeN-GLU na úroveň hodnoty GSH naměřené v erytrocytech statisticky průkazný ($P < 0,05$) v obou skupinách. V obou skupinách došlo v porovnání s kontrolou ke zvýšení úrovně GSH, avšak doba expozice byla v našem experimentu poměrně krátká (po dobu 10 dnů) pro projevení celkového rozsahu účinku selenu. Z výsledků tedy bylo zřejmé, že erytrocyty dobře reagovaly na přidávání selenu ve smyslu zvyšující se koncentrace GSH.

Cílem studie, kterou zkoumali Ghodbane a kol. (2011) byl vliv suplementace selenem na GSH a hladiny selenu v játrech, ledvinách, svalech a mozku u potkanů vystavených statickému magnetickému poli.

Dospělí samci potkanů byli rozděleny do kontrolní skupiny potkanů ($n = 6$), potkanů vystavených statickému magnetickému poli (po dobu 5 dnů), potkanů ošetřených selenem (seleničitan sodný 0,2 mg/l v pitné vodě po dobu 4 týdnů) a dalších exponovaných potkanů (selen po dobu 4 týdnů a statické magnetické pole během posledních 5 po sobě jdoucích dnů).

Subakutní expozice statickým magnetickým zářením vyvolala pokles hladiny selenu v ledvinách, svalech i mozku. Naproti tomu expozice statickým magnetickým zářením zvýšila celkové hladiny GSH v játrech. Suplementace selenem u potkanů vystavených statickému magnetickému záření obnovila hladiny selenu v ledvinách, svalech a mozku.

Výzkumy tedy naznačily, že subakutní expozice magnetickým zářením změnila antioxidační reakci snížením hladiny celkového selenu v ledvinách, svalech i v mozku. Významné bylo, že suplementace selenem zlepšila antioxidační kapacity ve tkáních potkanů vystavených statickému magnetickému záření. Selen tedy může mít ochranný účinek na jaterní parenchym, a to zejména ve stresových situacích.

V experimentu, který srovnával vliv suplementace selenu v organických a anorganických formách na oxidační/antioxidační bilanci v plicích potkanů studovali Musik a kol. (2013).

Cílem tohoto experimentu bylo porovnat účinek dvou nově syntetizovaných organických sloučenin se selenem s uplatněním seleničitanu sodného na oxidační procesy v plicích potkanů. Celková antioxidační aktivita, koncentrace neenzymatického antioxidantu redukovaného glutathionu (GSH) u laboratorních potkanů ošetřených různými selenovými sloučeninami (anorganický selenit a organický selenosemikarbazid

a selenazolin). Hodnoty celkové antioxidační aktivity byly zvýšeny ve srovnání s kontrolou bez doplnění selenem. Koncentrace glutathionu výrazně poklesla ve skupině se selenokarbazidem ve srovnání se skupinou, kde byl aplikován selenit o 33,8 %.

Selenové sloučeniny neměly statisticky významný vliv na činnost GSH, avšak došlo ke snížení GSH oproti kontrole o 47,3 % (selenosemikarbazid) a selenazolin neměl žádný účinek. In vitro studie na rakovinné buněčné linie mohou odhalit nové možnosti lékařských aplikací selenových částic.

V našem pokusu jsme sledovali vliv nanočástic selenu v játrech, kde účinek SeN na hodnoty GSH byl statisticky průkazně ($P < 0,05$) nižší v porovnání s kontrolou a úroveň GSH dosáhla hodnoty o 26,8 % méně.

Sochor a kol. (2012) ve své studii zkoumali vliv selenu v organické a anorganické formě na játra, ledviny, mozek a svaly u potkanů *Wistar*. Experiment byl zaměřen na zkoumání vlivu selenu a vybraných antioxidantů v modelech potkana stejně jako v našem experimentu, avšak s aplikací selenu v organické a anorganické formě.

Játra, ledviny, mozek a svaly byly odebrány po měsíčním podávání se čtyřmi různými dávkami selenu (0,075 mg nebo 1,5 mg anorganického nebo ve stejných hodnotách organického selenu na 1 kg krmiva). Bylo zjištěno významné snížení hladiny glutathionu v jaterní tkáni, bez ohledu na formu podávaného selenu.

V našem pokusu byla statisticky průkazná ($P < 0,05$) pouze hodnota ve skupině SeN v porovnání s kontrolou. U obou skupin SeN i SeN-GLU došlo ke snížení glutathionu.

7 ZÁVĚR

V provedeném experimentu byl zjišťován vliv různých forem a hladin selenu na koncentrace selenu ve tkáních jako je krev, plazma, játra a střevo. Stanovována byla i antioxidační aktivita v erytrocytech, plazmě a játrech pomocí metod FR a FRAP. Dále byly sledovány hodnoty redukovaného a oxidovaného glutathionu v organismu (GSH a GSSG).

Jako modelová zvířata pro tento experiment jsme použili samce laboratorních potkanů outbredního kmene *Wistar albino*. Samci potkanů byli rozděleni do tří skupin. Skupinám potkanů byly podávány různé hladiny (0 mg, 0,02 mg a 0,02 mg selenu/organismus/den + 0,1 mg glukózy/organismus/den) a formy (nanoselen a nanoselen modifikovaný glukózou) selenu.

Z výsledků našeho experimentu vyplývá, že samotný nanoselen měl průkazně příznivější účinek na konečnou koncentraci selenu v plazmě a střevech ($P < 0,05$) a nanoselen modifikovaný glukózou měl průkazně ($P < 0,05$) příznivější vliv na krev a játra. Aplikovaný nanoselen v obou skupinách tedy značně zvyšoval konečnou koncentraci selenu ve tkáních.

Antioxidační aktivita tkání se průkazně ($P < 0,05$) zvýšila pouze v plazmě ve skupině, kde byly aplikovány nanočástice selenu modifikované glukózou (měřeno metodou FR). Ostatní výsledky byly statisticky neprůkazné.

Obě formy nanoselenu měly vliv na úroveň redukovaného a oxidovaného glutathionu. V krvi došlo průkazně ($P < 0,05$) ke zvýšení hladiny GSH, v erytrocytech byly průkazně ($P < 0,05$) vyšší obě skupiny s nanoselenem, kde došlo ke zvýšení hladiny GSH s vyšším účinkem u SeN-GLU. V játrech došlo k průkaznému ($P < 0,05$) snížení GSH ve skupině SeN a v obou skupinách se průkazně ($P < 0,05$) snížily hodnoty naměřeného GSSG.

Z těchto výsledků je zřejmé, že SeN a SeN-GLU lze považovat jako alternativní zdroj selenu pro zvyšování koncentrace selenu ve tkáních organismu zvířat, zvyšování antioxidační aktivity v plazmě a zvyšování GSH v krvi a erytrocytech, který se vyznačuje vysokou použitelností.

Poznatky, které byly tímto pokusem zjištěny, lze uplatnit i v humánní oblasti. Pro zjištění nejideálnější hladiny nanoselenu pro člověka by ovšem bylo potřeba provést pokusy přímo na lidech.

8 POUŽITÁ LITERATURA

ABREU I. A. a D. E. CABELLI. Superoxide dismutases – a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. 2010, **1804**(2), 263–274 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.11.005. ISSN 1570-9639.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963909003367>.

AHMED ABDELALALEEM R. M., H. FAHMY ABDEL HAMEED, M. E.-S. ASKAR, S. H. MOHAMED HASSAN a A. I. ELBATAL. Modulatory Role of Selenium Nanoparticles and Grape Seed Extract Mixture on Oxidative Stress Biomarkers in Diabetic Irradiated Rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* [online]. 2016, **50**(1), 170–178 [cit. 2016-04-22]. DOI: 10.5530/ijper.50.1.21. ISSN 00195464.

Dostupné z: <http://www.ijper.org/article/388>.

AKIL M., U. GURBUZ, M. BICER, A. SIVRIKAYA, R. MOGULKOC a A. K. BALTACI. Effect of Selenium Supplementation on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes, and Lactate Levels in Rats Immediately After Acute Swimming Exercise. *Biological Trace Element Research* [online]. 2011, **142**(3), 651–659 [cit. 2016-04-20]. DOI: 10.1007/s12011-010-8785-z. ISSN 0163-4984.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-010-8785-z>.

ARMSTRONG D. *Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols*. Totowa, N. J.: Humana Press, c2002, 336 s. ISBN 0896038505.

ASARD H., J. MAY a N. SMIRNOFF. *Vitamin C: function and biochemistry in animals and plants*. New York: BIOS Scientific Publishers, 2004, 304 s. ISBN 1859962939.

BAJAJ M. E. EICHE, T. NEUMANN, J. WINTER a C. GALLERT. Hazardous concentrations of selenium in soil and groundwater in North-West India. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2011, **189**(3), 640–646 [cit. 2015-11-18]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.086. ISSN 03043894.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389411001087>.

BASU R. S. E. HAQUE, J. TANG, J. JI a K. H. JOHANNESSON. Evolution of selenium concentrations and speciation in groundwater flow systems: Upper Floridan (Florida) and Carrizo Sand (Texas) aquifers. *Chemical Geology* [online]. 2007, **246**(3-4), 147–169 [cit. 2015-11-16]. DOI: 10.1016/j.chemgeo.2007.09.010. ISSN 0009-2541. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009254107004020>.

BENNETT D. C. a K. M. CHENG. Selenium enrichment of table eggs. *Poultry Science* [online]. 2010, **89**(10), 2166–2172 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.3382/ps.2009-00571. ISSN 0032-5791.

Dostupné z: <http://ps.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.3382/ps.2009-00571>.

BATHIGE S. D. N. K., N. UMASUTHAN, G. I. GODAHEWA, W. S. THULASITHA, I. WHANG, S. H. WON, Ch. KIM a J. LEE. Two variants of selenium-dependent glutathione peroxidase from the disk abalone *Haliotis discus discus*: Molecular characterization and immune responses to bacterial and viral stresses. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2015, **45**(2), 648–655 [cit. 2016-03-02].

DOI: 10.1016/j.fsi.2015.05.028. ISSN 1050-4648.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464815300036>.

BOBROWSKA-GRZESIK E. *Chemical elements: compendium*. Český Těšín: 2 Theta, 2013, 223 s. ISBN 978-80-86380-66-7.

BOLANOS DE LA TORRE A. A. S., T. HENDERSON, P. S. NIGAM a R. K. OWUSU-APENTEN. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chemistry* [online]. 2015, **174**, 119–123 [cit. 2016-03-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.009. ISSN 0308-8146.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614017348>.

CAZES J. *Encyclopedia of chromatography*. 2. vyd. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, c2005, 800 s. ISBN 0824727878.

CULOTTA V. C., M. YANG a T. V. O'HALLORAN. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2006, **1763**(7), 747–758 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.003. ISSN 0167-4889.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488906001108>.

DAYAN N. *Skin aging handbook: an integrated approach to biochemistry and product development*. Norwich, NY: William Andrew, c2008, 216 s. ISBN 0815515847.

DASGUPTA N., S. RANJAN, D. MUNDEKKAD, Ch. RAMALINGAM, R. SHANKER a A. KUMAR. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. *Food Research International* [online]. 2015, **69**, 381–400 [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.01.005. ISSN 0963-9969.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691500006X>.

DENG J., W. CHENG a G. YANG. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry* [online]. 2011, **125**(4), 1430–1435 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.031. ISSN 0308-8146.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610012781>.

DIAS F. A., A. C. P. GANDARA, H. D. PERDOMO, R. S. GONÇALVES, C. R. OLIVEIRA, R. L. L. OLIVEIRA, M. C., C. R. POLYCARPO, D. SANTESMASSES, M. MARIOTTI, R. GUIGÓ, G. R. BRAZ, F. MISSIRLIS, P. L. OLIVEIRA. Identification of a selenium-dependent glutathione peroxidase in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2016, **69**, 105–114 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.08.007. ISSN 0965-1748. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174815300382>.

DUKHANDE V. V. *Glutathione depletion in neurodegenerative disorders*. USA: ProQuest, 2009, 131 s. ISBN 9781109141306.

DUMONT E., F. VANHAECKE a R. CORNELIS. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical*

Chemistry [online]. 2006, **385**(7), 1304–1323 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1007/s00216-006-0529-8. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-006-0529-8>

EITENMILLER R. a J. LEE. *Vitamin E: food chemistry, composition, and analysis*. New York: Marcel Dekker, c2004, 530 s. ISBN 0-8247-0688-9.

FORDYCE F. M. Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. *Essentials of Medical Geology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, 375 s. [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1007/978-94-007-4375-5_16. ISBN 978-94-007-4374-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-4375-5_16.

FORMAN H. J., O. AUGUSTO, R. BRIGELIUS-FLOHE, P. A. DENNERY, B. KALYANARAMAN, H. ISCHIROPOULOS, G. E. MANN, R. RADI, L. J. ROBERTS, J. VINA, K. J. A. DAVIES. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2015, **78**, 233–235 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504. ISSN 0891-5849. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584914010053>.

FORTIER M. E., I. AUDET, A. GIGUERE, J. P. LAFOREST, J. F. BILODEAU, H. QUESNEL a J. J. MATTE. Effect of dietary organic and inorganic selenium on antioxidant status, embryo development, and reproductive performance in hyperovulatory first-parity gilts. *Journal of Animal Science* [online]. 2012, **90**(1), 231–240 [cit. 2016-04-22]. DOI: 10.2527/jas.2010-3340. ISSN 0021-8812. Dostupné z: <http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/90/1/231>.

FREWER L. J., W. NORDE, A. FISCHER a F. KAMPERS. *Nanotechnology in the agri-food sector: implications for the future*. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, 328 s. ISBN 978-3-527-33060-7.

FRÖHDEOVÁ M., E. MRÁZKOVÁ a P. DOLEŽAL. Effect of selenium supplementation in the diet of cows and heifers at the drought on the content of Ig G in

serum. *13. BOKU - Symposium Tierernährung*. Wien: Universität f. Bodenkultur Wien, 2014, 179–182. ISBN 978-3-900932-16-9.

GABRYEL B., K. JARZĄBEK, G. MACHNIK, J. ADAMCZYK, D. BELOWSKI, E. OBUCHOWICZ a T. URBANEK. Superoxide dismutase 1 and glutathione peroxidase 1 are involved in the protective effect of sulodexide on vascular endothelial cells exposed to oxygen–glucose deprivation. *Microvascular Research* [online]. 2016, **103**, 26–35 [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.1016/j.mvr.2015.10.001. ISSN 0026-2862. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026286215300273>.

GHODBANE S., S. AMARA, C. GARREL, J. ARNAUD, V. DUCROS, A. FAVIER, M. SAKLY a H. ABDELMELEK. Selenium supplementation ameliorates static magnetic field-induced disorders in antioxidant status in rat tissues. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2011, **31**(1), 100–106 [cit. 2016-04-22]. DOI: 10.1016/j.etap.2010.09.010. ISSN 1382-6689. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668910001523>.

GROPPER S. S. a J. L. SMITH. *Advanced nutrition and human metabolism*. 6. vyd. Belmont, OH: Cengage Learning, 2012, 608 s. ISBN 9781133104056.

GÜLÇİN İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* [online]. 2012, **86**(3), 345–391 [cit. 2016-03-08]. DOI: 10.1007/s00204-011-0774-2. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-011-0774-2>.

HÁLA J. *Radioaktivní izotopy*. Tišnov: Sursum, 2013, 374 s. ISBN 978-80-7323-248-1.

HANDFORD C. E., M. DEAN, M. HENCHION, M. SPENCE, Ch. T. ELLIOTT a K. CAMPBELL. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2014, **40**(2), 226–241 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.09.007. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001988>.

HASELTON K. J., R. DAVID, K. FELL, E. SCHULTE, M. DYBAS, K. W. OLSEN a S. M. KANZOK. Molecular cloning, characterization and expression profile of a glutathione peroxidase-like thioredoxin peroxidase (TPxGl) of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Parasitology International* [online]. 2015, **64**(3), 282–289 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1016/j.parint.2014.02.004. ISSN 1383-5769. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576914000312>.

HATFIELD D. L, M. J. BERRY a V. N. GLADYSHEV. *Selenium: its molecular biology and role in human health*. 3. vyd. New York: Springer, c2012, 598 s. ISBN 978-1-4614-1024-9.

HICKEY S. a A. W. SAUL. *Vitamin C: the real story: the remarkable and controversial healing factor*. Laguna Beach, CA: Basic Health Publications, c2008, 316 s. ISBN 9781591202233.

HORKÝ P., P. JANČÍKOVÁ, J. SOCHOR, D. HYNEK, G. J. CHAVIS, B. RUTTKAY-NEDECKÝ, N. CERNEI, O. ZÍTKA, L. ZEMAN, V. ADAM, R. KIZEK. Effect of organic and inorganic form of selenium on antioxidant status of breeding boars ejaculate revealed by electrochemistry. *Inretnational journal of electrochemical science*, 2012, **7**(10), 9643–9657 [cit. 2015-12-11] ISSN: 1452-3981.

HORKÝ P., B. RUTTKAY-NEDECKÝ, M. KREMPLOVÁ, O. KRYŠTOFOVÁ, R. KENŠOVÁ, D. HYNEK, P. BABULA, O. ZÍTKA, L. ZEMAN, V. ADAM, R. KIZEK. Effect of Different Doses of Organically Bound Selenium on Antioxidant Status and Levels of Metal Ions in Postpartum Sows. *Inretnational journal of electrochemical science*, 2013, **8**(5), 6162–6179 [cit. 2015-12-11] ISSN: 1452-3981.

HORKÝ P. Effect of selenium on its content in milk and performance of dairy cows in ecological farming. *Potravinarstvo* [online]. 2015, **9**(1) [cit. 2015-12-11]. DOI: 10.5219/492. ISSN 1337-0960.

Dostupné z:

<http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/492>.

HUANG X., X. CHEN, Q. CHEN, Q. YU, D. SUN a J. LIU. Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs. *Acta Biomaterialia* [online]. 2016, **30**, 397–407 [cit. 2016-03-02].

DOI: 10.1016/j.actbio.2015.10.041. ISSN 1742-7061.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706115301707>.

CHARLES D. J. *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. New York: Springer, 2012, 612 s. ISBN 9781461443094.

CHUDOBOVÁ, D., K. ČÍHALOVÁ, S. DOSTÁLOVÁ, B. RUTTKAY-NEDECKÝ, M. A. M. RODRIGO, K. TMEJOVÁ, P. KOPEL, L. NEJDL, J. KUDR, J. GUMULEC, S. KRÍŽKOVÁ, J. KYNICKÝ, R. KIZEK a V. ADAM. Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on *Staphylococcus aureus* growth reveals potential for selenium particles to prevent infection. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2014, **351**(2), 195–201 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1111/1574-6968.12353. ISSN 0378-1097. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/1574-6968.12353>.

JANASZEWSKA A. a G. BARTOSZ. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2009, **62**(3), 231–236 [cit. 2016-04-22]. DOI: 10.1080/003655102317475498. ISSN 0036-5513.

Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/003655102317475498>.

KALÁČ P. *Funkční potraviny: kroky ke zdraví*. České Budějovice: Dona, 2003, 130 s. ISBN 80-7322-029-6.

KASPER H. *Výživa v medicíně a dietetika*. Praha: Grada, 2015, 572 s. ISBN 9788024745336.

KASTNEROVÁ M. *Poradce pro výživu*. České Budějovice: Nová Forma, 2011, 377 s. ISBN 978-80-7453-177-4.

KAY P. H. a CH. M. MUNSCH. *Techniques in extracorporeal circulation*. 4. vyd. London: Arnold, 2004, 384 s. ISBN 9781444114188.

KIPP A. P., D. STROHM, R. BRIGELIUS-FLOHÉ, L. SCHOMBURG, A. BECHTHOLD, E. LESCHIK-BONNET a H. HESEKER. Revised reference values for selenium intake. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2015, **32**, 195–199 [cit. 2016-02-21]. DOI: 10.1016/j.jtemb.2015.07.005. ISSN 0946-672x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X15300195>.

KLIMEŠOVÁ I. a J. STELZER. *Fyziologie výživy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, 177 s. ISBN 978-80-244-3280-9.

KOZIOROWSKA-GILUN M., L. FRASER, P. GILUN, M. KOZIOROWSKI a W. KORDAN. Activity of antioxidant enzymes and their mRNA expression in different reproductive tract tissues of the male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the pre-rut and rut seasons. *Small Ruminant Research* [online]. 2015, **129**, 97–103 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2015.05.006. ISSN 0921-4488. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448815001960>.

KREJČOVÁ S., B. Doušová a R. Kadlecová. *Chemické listy: Studium kontaminace zdrojů pitné vody selenem v obci Suchomasty (CHKO Český kras)*. Praha: Česká společnost chemická, 2013, **107**(3). ISSN 0009-2770.

KUMAR A. Ramesh a P. RIYAZUDDIN. Speciation of selenium in groundwater: Seasonal variations and redox transformations. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2011, **192**(1), 263–269 [cit. 2015-11-16]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.05.013. ISSN 0304-3894. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389411006364>.

LONG G. L. a J. D. WINEFORDNER. Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry* [online]. 1983, **55**(7), 712A–724A [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1021/ac00258a724. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00258a724>.

LUTZ C. A. a K. R. PRZYTULSKI. *Nutrition & diet therapy*. 5. vyd. Philadelphia, PA: F.A. Davis Company, 2011, 588 s. ISBN 978-0-8036-2202-9.

MAHIMA, A. K. VERMA, A. KUMAR, A. RAHAL, V. KUMAR, D. ROY. Inorganic versus organic selenium supplementation: A review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2012, **15**(9), 418–425. DOI: 10.3923/pjbs.2012.418.425. Dostupné z: <http://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2012.418.425>.

MAHN V. A., M. H. TOLEDO a H. M. RUZ. Organic and inorganic selenium compounds produce different protein patterns in the blood plasma of rats. *Biological Research*. 2009, **42**(2), 163–173. DOI: 10.4067/S0716-97602009000200004. Dostupné z: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-97602009000200004&script=sci_arttext.
MACH I. *Doplňky stravy: jaké si vybrat ve sportu i v každodenním životě*. Praha: Grada Publishing a.s., 2012, 176 s. ISBN 978-80-247-4353-0.

MATÉS J. M., C. PÉREZ-GÓMEZ a I. N. D. CASTRO. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* [online]. 1999, **32**(8), 595–603 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1016/S0009-9120(99)00075-2. ISSN 0009-9120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912099000752>.

MCMAHON B. K. a T. GUNNLAUGSSON. Selective Detection of the Reduced Form of Glutathione (GSH) over the Oxidized (GSSG) Form Using a Combination of Glutathione Reductase and a Tb(III)-Cyclen Maleimide Based Lanthanide Luminescent ‘Switch On’ Assay. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2012, **134**(26), 10725–10728 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1021/ja300887k. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja300887k>.

MELLEN M., M. FIKSELOVÁ, M. KAČÁNIOVÁ. *Aplikácia selénu pri produkcii funkčných potravín*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2011, 101 s. ISBN: 978-80-552-0653-0.

MELO L., T. R. BOTT a C. BERNANDO. *Fouling Science and Technology*. Nizozemí: Springer Science, 2012, 744 s. ISBN 9789400928138.

MILLER A.-F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters* [online]. 2012, **586**(5), 585–595 [cit. 2016-03-06].

DOI: 10.1016/j.febslet.2011.10.048. ISSN 0014-5793.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2011.10.048>.

MIWA S., K. B. BECKMAN a F. MULLER. *Oxidative stress in aging from model systems to human diseases*. New York: Springer, 2008, 320 s. ISBN 9781597454209.

MOHAPATRA P., R. K. SWAIN, S. K. MISHRA a kol. Effects of Dietary Nano-Selenium Supplementation on the Performance of Layer Grower Birds. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* [online]. 2014, **9**(10), 641–652 [cit. 2016-04-20].

DOI: 10.3923/ajava.2014.641.652. ISSN 1683-9919.

Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajava.2014.641.652>.

MUSIK I., M. KIEŁCZYKOWSKA a J. KOCOT. Comparison of the influence of selenium supplementation in organic and inorganic forms on oxidant/antioxidant balance in rat lungs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* [online]. 2013, **57**(3), 449–453 [cit. 2016-04-20]. DOI: 10.2478/bvip-2013-0078. ISSN 0042-4870. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/bvip.2013.57.issue-3/bvip-2013-0078/bvip-2013-0078.xml>.

NANCHARAI AH Y. V. a P. N. L. LENS. Selenium biomineralization for biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(6), 323–330 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.03.004. ISSN 0167-7799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915000669>.

NAVARRO-ALARCON M. a C. CABRERA-VIQUE. Selenium in food and the human body: A review. *Science of The Total Environment* [online]. 2008, **400**(1-3), 115–141 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.024. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969708006785>.

NIEDZIELSKI P., M. RUDNICKA, M. WACHELKA, L. KOZAK, M. RZANY, M. WOZNIAK a Z. KASKOW. Selenium species in selenium fortified dietary

supplements. *Food Chemistry* [online]. 2016, **190**, 454–459 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.125. ISSN 0308-8146.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615008699>.

NOLLET L. M. a F. TOLDRÁ. *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*. Boca Raton, FL: CRC Press, c2012, 956 s. ISBN 1439815909.

ÖTLEŞ S. *Methods of analysis of food components and additives*. 2. vyd. Boca Raton: Taylor & Francis, 2012, 519 s. ISBN 978-1-4398-1552-6.

PAPADOPOULOS K. N. *Food chemistry research developments*. New York: Nova Science Publishers, c2008, 297 s. ISBN 1604562625.

PARISH T. a A. BROWN. *Mycobacterium: genomics and molecular biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2009, 213 s. ISBN 1904455409.

PASSWATER R. A. *Vše o selenu*. Praha: Pragma, 2003, 98 s. ISBN 80-7205-902-5.

PAVLATA L., L. MISUROVÁ, A. PECHOVÁ a R. DVOŘÁK. The effect of inorganic and organically bound forms of selenium on glutathione peroxidase activity in the blood of goats. *Veterinary medicine*. 2011, **56**(2), 75–81. ISSN 1803-3830.

PAVLÍK A. a P. SLÁMA. *Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011, 142 s. ISBN 978-80-7375-479-2.

PECHOVÁ A., L. PAVLATA, E. PITROPOVSKÁ a K. HAUPTMANOVÁ. Interaction between selenium and iodine during supplementation of these elements in dairy goats. *XIV Middle European Buiatrics Congress*. 2014, 173 s. ISBN 978-83-63654-18-4.

PECHOVÁ A., L. ANTOŠOVÁ, L. PAVLATA a A. PODHORSKÝ. Effect of sodium selenite or lactate-protein selenium complex supplementation on selenium status in goat

kids. *Czech Journal of Animal Science* [online]. 2015, **60**(1), 16–24 [cit. 2015-12-11]. DOI: 10.17221/7907-CJAS. ISSN 1212-1819.

Dostupné z:

<http://www.agriculturejournals.cz/web/cjas.htm?volume=60&firstPage=16&type=publishedArticle>.

PERRY J. J. P., D. S. SHIN, E. D. GETZOFF a J. A. TAINER. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. 2010, **1804**(2), 245–262 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.11.004. ISSN 1570-9639.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963909003355>.

PICÓ G. Y. *Chemical analysis of food: techniques and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2012, 798 s. ISBN 978-0-12-384862-8.

PITTER P. *Hydrochemie*. 4. aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009, 579 s. ISBN 978-80-7080-701-9.

PORTUNE K. J. *Examinations on harmful algal cyst distribution, germination, and reactive oxygen species production within Delaware's Inland Bays*. USA: ProQuest, 2008, 210 s. ISBN 9780549812043.

PROUSEK J. *Rizikové vlastnosti látok*. 2. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2005, 247 s. ISBN 80-227-2199-9.

PRYOR W. A. *Bio-assays for oxidative stress status (BOSS)*. New York: Elsevier, 2001, 296 s. ISBN 0080929923.

RACEK, J. *Oxidační stres a jeho ovlivnění*. Praha: Galén, c2003, 89 s. ISBN 80-7262-231-5.

RAMYA S., T. SHANMUGASUNDARAM a R. BALAGURUNATHAN. Biomedical potential of actinobacterially synthesized selenium nanoparticles with special reference to anti-biofilm, anti-oxidant, wound healing, cytotoxic and anti-viral activities. *Journal*

of Trace Elements in Medicine and Biology [online]. 2015, **32**, 30–39 [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.1016/j.jtemb.2015.05.005. ISSN 0946-672x.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X1530002X>.

REILLY C. Selenium: A new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1998, **9**(3), 114–118 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1016/S0924-2244(98)00027-2. ISSN 0924-2244.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224498000272>.

REISNER D. E. *Bionanotechnology II: global prospects*. Boca Raton: CRC Press, 2012, 583 s. ISBN 9781439804643.

REZVANFAR M. A., M. A. REZVANFAR, A. R. SHAHVERDI, A. AHMADI, M. BAEERI, A. MOHAMMADIRAD a M. ABDOLLAHI. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2013, **266**(3), 356–365 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.taap.2012.11.025. ISSN 0041-008x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X12005145>.

SEN, C. L. PACKER a O. HÄNNINEN. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Burlington: Elsevier, 2000, 1220 s. ISBN 9780080538297.

SHI, L., R. YANG, W. YUE, W. XUN, Ch. ZHANG, Y. REN, L. SHI a F. LEI. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Animal Reproduction Science* [online]. 2010, **118**(2-4), 248–254 [cit. 2016-02-28]. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2009.10.003. ISSN 0378-4320. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432009002504>.

SHI L., W. XUN, W. YUE a kol. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Ruminant Research* [online]. 2011, **96**(1), 49–52 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.11.005. ISSN 09214488. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448810003068>.

SCHAICH K.M., X. TIAN a J. XIE. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* [online]. 2015, **14**, 111–125 [cit. 2016-02-29].

DOI: 10.1016/j.jff.2015.01.043. ISSN 1756-4646.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175646461500047x>.

SCHMIDT P. *Veterinární medicína založená na důkazech*. Praha: Pierot, 2008, s. 410–617. ISBN 978-80-7353-106-5.

SCHMIDT R. H. a G. E. RODRICK. *Food safety handbook*. Hoboken: Wiley-Interscience, 2003, 850 s. ISBN 0-471-21064-1.

SIGEL A., H. SIGEL a R. K. SIGEL. *Interrelations between essential metal ions and human diseases*. New York: Springer, 2013, 537 s. ISBN 978-94-007-7499-5.

SIM J., S. NAKAI a W. GUENTER. *Egg nutrition and biotechnology*. New York, NY, USA: CAB International Pub., c2000, 493 s. ISBN 0851993303.

SIRCUS M. *Selenium medicine*. Washington: IMVA Publications, 2014, 190 s. ISBN 9781329203624.

SÖHNEL O. *Průmyslové technologie I*. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2010, 178 s. ISBN 978-80-7414-311-3.

SOCHOR J., M. POHANKA, B. RUTTKAY-NEDECKÝ, O. ZÍTKA, D. HYNEK, P. MAREŠ, L. ZEMAN, V. ADAM, R. KIZEK. Effect of selenium in organic and inorganic form on liver, kidney, brain and muscle of Wistar rats. *Central European Journal of Chemistry* [online]. 2012, **10**(5), 1442–1451 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.2478/s11532-012-0064-8. ISSN 2391-5420.

Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/chem.2012.10.issue-5/s11532-012-0064-8/s11532-012-0064-8.xml>.

SOLOVYEV N. D. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 2015, **153**, 1–12 [cit. 2016-03-01].

DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.09.003. ISSN 0162-0134.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013415300799>

SPEIGHT S. M., M. J. ESTIENNE, A. F. HARPER, R. J. CRAWFORD, J. W. KNIGHT a B. D. WHITAKER. Effects of dietary supplementation with an organic source of selenium on characteristics of semen quality and in vitro fertility in boars. *Journal of Animal Science* [online]. 2012, **90**(3), 761–770 [cit. 2016-02-24].

DOI: 10.2527/jas.2011-3874. ISSN 0021-8812. Dostupné z:

<http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/90/3/761>.

SURAI P. F. *Selenium in nutrition and health*. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2006, 974 s. ISBN 1-904761-16-x.

SURAI P. F. a J. A. TAYLOR-PICKARD. *Current advances in selenium research and applications*. Wageningen: Wageningen Acad. Publ., 2008, 351 s. ISBN 978-90-8686-073-9.

SUZUKI S., T. TANAKA, M. V. POYUROVSKY, H. NAGANO, T. MAYAMA, S. OHKUBO, M. LOKSHIN, H. HOSOKAWA, T. NAKAYAMA, Y. SUZUKI, S. SUGANO, E. SATO, T. NAGAO, K. YOKOTE, I. TATSUNO, C. PRIVES. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(16), 7461–7466 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1073/pnas.1002459107. ISSN 0027-8424.

Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002459107>.

SVAČINA Š. *Poruchy metabolismu a výživy*. Praha: Galén, 2010, 505 s. ISBN 978-80-7262-676-2.

ŠTÍPEK S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.

TINGGI U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine* [online]. 2008, **13**(2), 102–108 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1007/s12199-007-0019-4. ISSN 1342-078x.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12199-007-0019-4>.

VALAPPIL M. P., S. SANTHAKUMAR a S. ARUMUGAM. Determination of Oxidative Stress Related Toxicity on Repeated Dermal Exposure of Hydroxyapatite Nanoparticles in Rats. *International Journal of Biomaterials* [online]. 2014, **2014**, 1–8 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.1155/2014/476942. ISSN 1687-8787. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijbm/2014/476942/>.

VELÍŠEK J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

WANG T., X. LONG, Z. LIU, Y. CHENG a S. YAN. Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2015, **44**(2), 674–682 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.03.030. ISSN 1050-4648. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464815001394>.

WANG Y. X., X. A. ZHANG, D. YUAN, X. W. ZHANG, R. J. WU. Effects of selenomethionine and sodium selenite supplementation on quality, selenium distribution and antioxidant status in broilers. *Czech Journal of Animal Science* [online]. 2011, **56**(7), 305–313. ISSN: 1212-1819.

XU Y., L. ZHANG, Y. LIU, Z. JIN, Q. ZHAO, F. YANG a D. XIAO. Sensitive and selective determination of GSH based on the ECL quenching of Ru (II) 1,10-phenanthroline-5,6-dione complex. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **77**, 182–187 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.033. ISSN 0956-5663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566315304292>.

ZADÁK Z. *Magnezium a další minerály, vitaminy a stopové prvky ve službách zdraví*. Břeclav: Adamira, 2010, 79 s. ISBN 978-80-904217-0-7.

ZAPLETAL O. *Speciální veterinární toxikologie pro posluchače Fakulty veterinární hygieny a ekologie a posluchače Fakulty veterinárního lékařství*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001, 148 s. ISBN 80-7305-403-5.

ZEIN ELDIN A. F. M. a H. A. IBRAHIM. Some biochemical changes and activities of antioxidant enzymes in developing date palm somatic and zygotic embryos in vitro. *Annals of Agricultural Sciences* [online]. 2015, **60**(1), 121–130 [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.1016/j.aoas.2015.04.002. ISSN 0570-1783.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S057017831500010X>.

ZHANG S., A. PATEL., CH. CHU, W. JIANG, L. WANG, S. E. WELTY, B. MOORTHY a B. SHIVANNA. Aryl hydrocarbon receptor is necessary to protect fetal human pulmonary microvascular endothelial cells against hyperoxic injury: Mechanistic roles of antioxidant enzymes and RelB. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2015, **286**(2), 92–101 [cit. 2015-12-28]. DOI: 10.1016/j.taap.2015.03.023. ISSN 0041-008x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X15001143>.

ZHENG L., M. ZHAO, CH. XIAO, Q. ZHAO a G. SU. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chemistry* [online]. 2016, **192**, 288–294 [cit. 2016-03-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.015. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615010201>.

ZIMA T. *Laboratorní diagnostika*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, 906 s. ISBN 978-80-7262-372-3.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obr. 1 Redukční reakce pro FRAP metodu. | 37 |
| Obr. 2 Strukturální vzorec barevného radikálu ABTS ^{•+} | 38 |
| Obr. 3 Strukturální vzorec barevného radikálu DPPH | 39 |
| Obr. 4 Nanočástice selenu | 45 |
| Obr. 5 Nanočástice selenu s glukózou | 45 |

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tab. 1 Obsah selenu v potravinách a nápojích..... | 11 |
| Tab. 2 Výskyt celkového selenu v půdě vybraných států | 13 |
| Tab. 3 Odhadované hodnoty pro adekvátní příjem selenu | 17 |
| Tab. 4 Účinky nedostatku a nadbytku selenu u zvířat a lidí | 21 |
| Tab. 5 Hlavní předpokládané přínosy a rizika nanotechnologických aplikací v potravinách a souvisejících produktech..... | 42 |

Seznam grafů

| | |
|---|----|
| Graf 1 Vliv SeN a SeN-GLU na koncentraci selenu v krvi. | 50 |
| Graf 2 Vliv SeN a SeN-GLU na koncentraci selenu v plazmě. | 51 |
| Graf 3 Vliv SeN a SeN-GLU na koncentraci selenu v játrech. | 52 |
| Graf 4 Vliv SeN a SeN-GLU na koncentraci selenu ve střevech..... | 53 |
| Graf 5 Stanovení antioxidační aktivity v plazmě metodou FR. | 54 |
| Graf 6 Stanovení antioxidační aktivity v plazmě metodou FRAP. | 55 |
| Graf 7 Stanovení antioxidační aktivity v játrech metodou FR..... | 56 |
| Graf 8 Stanovení antioxidační aktivity v játrech metodou FRAP. | 57 |
| Graf 9 Stanovení antioxidační aktivity v erytrocytech metodou FR. | 58 |
| Graf 10 Stanovení antioxidační aktivity v erytrocytech metodou FRAP. | 59 |
| Graf 11 Účinek SeN a SeN-GLU na úroveň GSH a GSSG v krvi. | 60 |
| Graf 12 Účinek SeN a SeN-GLU na úroveň GSH a GSSG v erytrocytech. | 61 |
| Graf 13 Účinek SeN a SeN-GLU na úroveň GSH a GSSG v játrech. | 62 |

10 SEZNAM ZKRATEK

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

ABTS^{•+} – radikál generovaný oxidací ABTS

AIDS – syndrom získaného selhání imunity

CAP – captopril

CAT – kataláza

Cl⁻ – chloridový aniont

CMQT – 2-chloro-methylchinolin

CO₃^{•-} – uhličitanový radikál

Cu⁺ – měďný kation

Cys – cystein

CZE – kapilární zónová elektroforéza

ČR – Česká republika

DAD – detektor diodového pole

DACH – referenční hodnoty pro příjem živin výživových společností v Německu, Rakousku a Švýcarsku

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DPPH – 2,2-difenylypikrylhydrazyl

DTNB – 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

ECD – elektrochemický detektor

Fe²⁺ – železnaté kationty

Fe³⁺ – železité kationty

FLD – fluorescenční detektorový systém

FRAP – antioxidační síla založená na redukci železitých iontů

GGC – γ -glutamyl cystein

GPx – glutathionperoxidáza

GR – glutathionreduktáza

GSSG – oxidovaná forma glutathionu

GSH – redukováná forma glutathionu

HClO – kyselina chlorná

HCys – homocystein

H₂O – voda

H₂O₂ – peroxid vodíku

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
H₂Se – hydrid selenu
mFRAP – metoda FRAP založená na bázi mikrotitračních destiček
MS – hmotnostní spektrometrie
n-3 mastné kyseliny – skupina nenasycených mastných kyselin, jejichž společným rysem je dvojná vazba mezi uhlíky na třetím místě (počítáno od koncového metylu).
NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát
NEM – N-ethylmaleimidu
NO – oxid dusnatý
NO[•] – volný radikál oxidu dusnatého
NO₂⁻ – dusitan
NO₂ – oxid dusičitý
NO₂[•] – volný radikál oxidu dusičitého
NO₃ – dusičnan
NOS2/iNOS – cytoplazmatická indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
NPM – N-1-(pyrenyl)maleimid
O₂ – kyslík
O^{•-} – superoxidový radikál
OCl⁻ – chlornanový aniont
OH⁻ – hydroxidový aniont
OH[•] – hydroxylový radikál
ONOO⁻ – peroxyinitrit
P – pravděpodobnost
pH – záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
RNS – reaktivní formy dusíku
ROS – reaktivní formy kyslíku
SeCys – selenocystein
SeGPx – glutathionperoxidáza závislá na selenu
SePP – selenoprotein P
SMSeC – selenomethylselenocystein
SOD – superoxidodismutáza
TAC – celková antioxidační kapacita
TCEP – tris(2-karboxyethyl)fosfin

TEAC – antioxidační kapacita ekvivalentní troloxu

T-lymfocyty – druh bílých krvinek

TPTZ – 2,4,6-Tripyridyl-s-triazin

UK – Spojené království Velké Británie a Severního Irska

USA – Spojené státy americké

UV-Vis ultrafialové viditelné záření