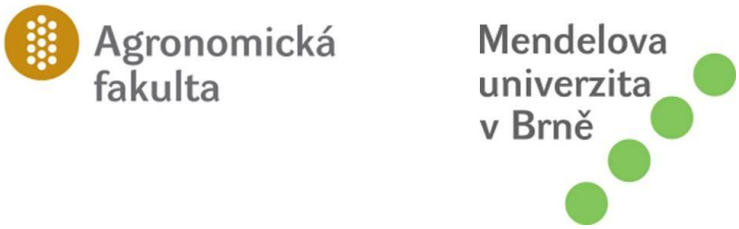
MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017 **Bc. ŽANETA KONVALINOVÁ**

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav výživy zvířat a pícninářství



Vliv zdroje zinku na antioxidační status laboratorních potkanů

Diplomová práce

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

Vypracovala:
Bc. Žaneta Konvalinová

Brno 2017

ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv zdroje zinku na antioxidační status 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 a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, 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

Dovoluji si tímto poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu doc. Ing. Pavlu Horkému, Ph. D. za jeho připomínky, cenné rady a odborné vedení. Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia.

ABSTRAKT

Zinek je esenciálním prvkem, jež má v našem organismu řadu významných funkcí. Cílem práce bylo ověřit vliv dietních zinkových nanokomplexů jako alternativního zdroje zinku pro živočišný organismus.

Jako experimentální model pro tento pokus byli použiti samci laboratorního potkana outbredního kmene *Wistar albino.* Potkani byli rozděleni do 3 skupin. V každé skupině bylo ustájeno 6 samců. První skupina (kontrola) (n = 6) potkanů sloužila jako kontrolní a nebyla jí dávka zinku navýšena. Druhé skupině (Zn-EDT) zvířat (n = 6) byly dávkovány zinkové nanočástice (v množství 200 mg/kg diety). Třetí skupině (Zn-NTA) potkanů (n = 6) byl dávkován zinek ve formě zinkových nanočástic (v množství 200 mg/kg diety). Potkani byli po 15 dnech trvání experimentu usmrceni. Od zvířat byly získány vzorky erytrocytů a jater, které byly ihned po odběru podrobeny patřičným analýzám. Byla analyzována antioxidační aktivita pomocí metod FR a DPPH, aktivita SOD, metallothionein a koncentrace zinku. Výsledky ukazují, že v erytrocytech došlo ke snížení antioxidační kapacity, jež bylo u Zn-NTA statisticky průkazné ($P < 0,05$). Koncentrace zinku v erytrocytech se neprůkazně zvýšila. V játrech došlo ke statisticky průkaznému zvýšení ($P < 0,05$) metallothioneinu.

Klíčová slova: zinek, nanočástice, oxidační stres, antioxidanty

ABSTRACT

Zinc is an essential element that has many important functions in our organism. The objective of the thesis is to verify the effect of dietary zinc nanocomplexes as an alternative source of zinc for the animal organism.

For the experimental model of this experiment male rats of the outbred strain *Wistar albino* were used. The rats were divided into 3 groups. Six males were housed in each group. The first group (control) (n = 6) of the rats served as a control one and the zinc dose was not increased. The second group (Zn-EDT) of animals (n = 6) was dosed with zinc nanoparticles (200 mg/kg diet). The third group (Zn-NTA) of rats (n = 6) was dosed with zinc in the form of zinc nanoparticles (200 mg/kg diet). The rats were sacrificed after 15 days of experimentation. The animals samples of erythrocytes and liver were extracted and subjected to appropriate analyses immediately after collection. Antioxidant activity was analysed using FR and DPPH methods, SOD activity, metallothionein and zinc concentration. The results show that the antioxidant capacity in the erythrocytes decreased statistically in Zn-NTA ($P < 0.05$). The concentration of zinc in erythrocytes has increased inconclusively. There was a statistically significant increase ($P < 0.05$) of metallothionein in the liver.

Key words: zinc, nanoparticles, oxidative stress, antioxidants

OBSAH

1 ÚVOD 9

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED 10

2.1 ZINEK 10
2.2 VOLNÉ RADIKÁLY 21
2.3 OXIDAČNÍ STRES 24
2.4 ANTIOXIDANTY 25

3 CÍL PRÁCE 36

4 MATERIÁL A METODIKA 37

4.1 PŘÍPRAVA ZINKOVÝCH ČÁSTIC 38
4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ METALLOTHIONEINU V ERYTROCYTECH A JÁTRECH 38
4.3 STANOVENÍ METALLOTHIONEINU (MT) 38
4.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ ENZYMŮ A ANTIOXIDAČNÍHO POTENCIÁLU 39
4.5 STANOVENÍ SUPEROXIDDISMUTÁZY (SOD) 39
4.6 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ METODY FREE RADICALS (FR) 40
4.7 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ DPPH• TESTU 40
4.8 MIKROVLNNÁ DIGESCE PRO ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROMETRII (AAS) 40
4.9 STANOVENÍ ZINKU POMOCÍ AAS 41
4.10 STATISTIKA (ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ) 41

5 VÝSLEDKY 42

5.1 VÝSLEDKY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH V ERYTROCYTECH A JÁTRECH 42
5.2 VÝSLEDKY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU FREE RADICALS (FR) V ERYTROCYTECH A JÁTRECH 43
5.3 VÝSLEDKY STANOVENÍ AKTIVITY SUPEROXIDDISMUTÁZY (SOD) V ERYTROCYTECH A JÁTRECH 44
5.4 VÝSLEDKY STANOVENÍ METALLOTHIONEINU (MT) V ERYTROCYTECH A JÁTRECH 45
5.5 VÝSLEDKY STANOVENÍ ZINKU (ZN) V ERYTROCYTECH A JÁTRECH 46

6 DISKUZE 47

7 ZÁVĚR 50

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 51

9 SEZNAM PŘÍLOH 65

10 SEZNAM ZKRATEK 66

1 ÚVOD

Tato práce se zabývá vlivem zinku na živočišný organismus ve formě nanokomplexů. Zinek je pro člověka významným esenciálním prvkem. V organismu je součástí mnoha důležitých enzymů. Je nezbytný pro správný růst a vývoj organismu, účastní se tvorby inzulinu a má vliv na snižování oxidačního stresu.

Aktuálním tématem jsou volné radikály, jež patří mezi velmi reaktivní částice. Vznikají exogenní a endogenní cestou (např. znečištěné prostředí, cigaretový kouř, stres). Při nadměrném množství volných radikálů v organismu vzniká oxidační stres. Způsobuje řadu onemocnění (např. nádorové, kardiovaskulární, neurodegenerativní, alergie, urychluje stárnutí). Zinek je významným antioxidantem (redukuje volné radikály), který je mimo jiné součástí antioxidačního enzymu superoxiddismutázy. Metallothionein je protein, jež organismus také chrání před oxidačním stresem.

Nanočástice (1 − 100 nm) se dnes využívají v různých oborech jako například lékařství, zemědělství, textilní či kosmetický průmysl. Avšak v oblasti výživy bývají nanočástice relativně opomíjeny.

Cílem experimentu bylo zjistit vliv dvou forem nanočástic zinku (Zn-EDTA a Zn-NTA) na kncentraci zinku a antioxidační status laboratorních potkanů kmene *Wistar albino*. Nanočástice byly zvířatům aplikovány do diety v množství 200 mg/kg po dobu 15 dní. V erytrocytech a játrech byly analyzovány: antioxidační aktivita pomocí metod Free Radicals (FR) a DPPH, aktivita superoxiddismutázy (SOD), metallothionein a koncentrace zinku.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

V následném literárním přehledu se budeme zabývat působením zinku v živočišném organismu s návazností na použití nanotechnologií.

2.1 Zinek

2.1.1 Charakteristika

Zinek (latinsky *Zincum*, Zn) je středně tvrdý křehký modrobílý kov, na lomu krystalický a lesklý. V periodické tabulce prvků se nachází ve čtvrté periodě a dvanácté skupině společně s kadmiem a rtutí. Zinek se vyskytuje ve formě dvoumocného iontu, kdy jsou jeho d-orbitaly kompletně zaplněny elektrony a nemůže tak podléhat redoxním změnám. Atomové číslo zinku je 30, atomová hmotnost 65,409 a bod tání 419,4 °C. Řadí se mezi biogenní prvky, což znamená, že je pro život nezbytný. Fyzikálně-chemické vlastnosti mu předurčují mimořádné využití a důležitost v biologických systémech. Podle Kaspera (2015) je zinek důležitou součástí enzymového systému, který působí antioxidačně. Zabraňuje tak, společně s vitaminy a selenem, tvorbě mediátorů zánětu v těle.

Název kovu je pravděpodobně odvozen od německého slova *Zinke* (zub). Mosaz, slitina zinku a mědi, byla používána již před naším letopočtem. Samotný zinek byl objeven německým chemikem A. S. Marggrafem až roku 1746. Dnes patří k nejpoužívanějším kovům (Bobrowska-Grzesik et al., 2013). Od roku 1974 byl zinek zařazen mezi esenciální stopové prvky. Dnes je zřejmé, že patří mezi esenciální prvky jak pro člověka, tak pro rostliny a zvířata (Dastych, 2004).

Zinek se v životním prostředí vyskytuje ve více podobách, nejvýznamnější rudou je minerál sfalerit (blejno zinkové, ZnS). Další minerály jsou například smithsonit (kalamín uhličitý, $ZnCO_3$), willemit (Zn_2SiO_4) a zinkit (červená ruda, ZnO). Zinková ruda sfalerit má téměř diamantový lesk. Barvy může být černé, hnědé, zelené, oranžové, žluté či bezbarvé. Naleziště jsou v USA, Mexiku, Španělsku, Bulharsku, Srbsku, Rusku, Japonsku, ale i na Slovensku. K výrobě mosazi se již nepoužívá (používá se např. smithsonit). Minerály zinkit a wurtzit jsou tak vzácné, že nemají hospodářský význam (Hochleitner, 2015; Korbel, Novák, 2013).

Z hlediska kvantitativního se minerální látky dělí dle obsahu v těle dospělého člověka na majoritní, minoritní (zinek) a stopové prvky. Kvalitativně lze prvky

charakterizovat jako esenciální, neesenciální a toxické (olovo, rtuť, kadmium, arsen) (Komprda, 2003). Minerální látky si naše tělo neumí syntetizovat, proto musí být přijímány z vnějších zdrojů. Ač nemají energetickou hodnotu, jsou pro organismus nezbytné. Nachází se v tkáních, enzymech, hormonech, ale jsou součástí i antioxidantů.

V těle se minerální látky nachází ve formě iontů nebo solí, kde jsou součástí organických sloučenin. Biologické funkce těchto látek jsou velmi rozmanité, například jsou stavebním materiálem pro tkáně, udržují propustnost buněčných membrán, transformují energii a její využití, ovlivňují nervové dráhy, jsou součástí enzymových systémů, mají detoxikační a antioxidační účinky atd. Mezi prokázané esenciální prvky patří železo, zinek, selen, mangan, měď, molybden, kobalt, chrom a jod (Stránský, Ryšavá, 2014). Pouhými 0,1 – 0,2 % (10 g) hmotnosti celého organismu jsou tvořeny všechny stopové prvky v lidském těle (Kasper, 2015).

2.1.2 Výskyt v životním prostředí

Do životního prostředí se zinek většinou dostává jako výsledek důlní činnosti, rafinace, výroby oceli, spalování uhlí a odpadů, ale také odpadními vodami z domácností (Kenšová et al., 2014). Poměrně bohatě je zastoupen v zemské kůře, kde jeho obsah činí asi 100 mg/kg. Značně vysoká koncentrace je i v mořské vodě, a to 0,01 mg/l (Juříková, 2013).

Zinek je nezbytným i pro rostliny a zvířata. Jeho dostupnost v půdě pro rostliny je ovlivněna nízkým obsahem zinku, vysokým pH, vysokou koncentrací sodíku, vápníku a hořčíku. Mezi náchylné plodiny na jeho nedostatek patří kukuřice. Při jeho nedostatku v půdě se využívá hnojení nebo biofortifikace obilných zrn (Alloway, 2009). Aplikace zinečnatých hnojiv zvyšuje jeho obsah v kořenech, listech, stoncích plodin, plodinách a má i vliv na obsah látek s antioxidačními účinky, např. v obilných zrnech. Celková antioxidační kapacita je však také záležitostí odrůdy (Mareček et al., 2011; White, Broadley, 2011).

Je-li u zvířat nedostatečný přísun zinku, jejich růst je snižován až o 15 %. U samců může docházet k poruchám spermiogeneze a zpomalování vývinu pohlavních znaků. Samice mohou mít obtíže s absencí říjového cyklu (Pavlík, Sláma, 2015). Zinek také ovlivňuje fermentační procesy v bachoru přežvýkavců. Je nezbytným pro růst a rozmnožování bachorové mikroflóry, k tvorbě celulolytických enzymů, mikrobiálních proteinů a těkavých mastných kyselin (Jelínek, Koudela, 2003).

Zinek je například u prasat významnou složkou výživy. Jeho příjem v krmivu je preventivně hlídán již u selat. Ta mohou při jeho deficitu onemocnět parakeratózou, která může vést až ke smrti (Zeman et al., 2004). Projevuje se typickými změnami kůže, způsobené nadměrnou tvorbou nedostatečně zrohovatělého keratinu. Na některých partiích může docházet k vypadávání srsti, tvorbě suchých šupin šedé až světle hnědé barvy, tvořící strupovité krusty, způsobující až zježení srsti (Pavlík, Sláma, 2015). Při špatném využívání, při nedostatku zinku v krmivu u zvířat, mohou být pozorovány také tyto obtíže: nechuť ke krmivu, zaostalý růst, poruchy metabolismu živin či reprodukční poruchy. Je-li nízká koncentrace zinku v krmných dávkách, je nutné dodávat zvířatům minerální krmiva. A to nejlépe ve formě organicky vázaného zinku na aminokyseliny. Je také důležité hlídat jeho obsah v krmných směsích, aby nedošlo k předávkování i přesto, že jsou zvířata poměrně tolerantní. Obecně platí, že zinek je nejlépe stravitelný z krmiv mléčného původu (Tvrzník, Zeman, 2005; Jelínek, Koudela, 2003). Z krmiva je využitelnost zinku v krmné dávce negativně ovlivněna nadbytkem vápníku, fosforu, železa a mědi. Se zinkem na důležitých vazebných místech v buňkách soutěží kadmium. Míra resorpce je vyšší u mláďat (Pavlík, Sláma, 2015).

2.1.3 Organická a anorganická forma

Chemická forma zinku ovlivňuje jeho vstřebatelnost, využívány jsou formy organické a anorganické. Organické formy jsou obecně lépe stravitelné, a to zejména formy chelátové. Chelát v překladu znamená kleště, těmi jsou právě aminokyseliny svírající minerální látku, jež je takto pro organismus lépe absorbována.

Navázáním kovu na chelát jsou ovlivněny všechny procesy metabolismu, je udržována optimální hladina mikroprvků v organismu v porovnání s formou anorganickou. Z anorganických forem se využívají síran, oxid či uhličitan zinečnatý. Použitím síranů ve větším množství je účinek lipofilních vitaminů snižován (Zeman et al., 2004; Tvrzník, Zeman, 2005). Míra resorpce je z oxidové a síranové formy nízká, většinou do 15 %. Vhodnějšími formami jsou zinek organicky vázaný na aminokyseliny, kdy vstřebatelnost dosahuje až 60 % (Jelínek, Koudela, 2003).

Kratochvílová et al. (2007) zjišťovali vliv tří chelátových preparátů a jedné anroganické formy na růst laboratorních potkanů. Zjistili, že organická forma preparátu může mírně zvýšit přírůstek zvířete, avšak záleží i na kvalitě použitého doplňku zinku.

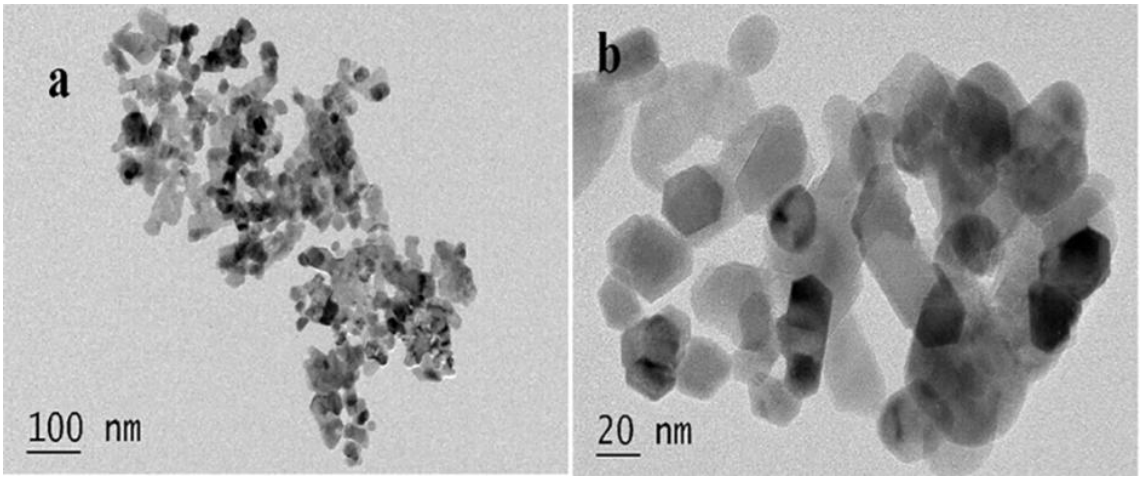
Jeden z chelátových doplňků vykazoval horší výsledky než kontrolní anorganická forma.

2.1.3.1 Cheláty

Některé látky jsou schopny tvořit s dvojvaznými a trojvaznými kovovými ionty cheláty, vázány koordinační vazbou. Cheláty se mohou vyznačovat vhodnými fyzikálními vlastnostmi, např. teplota tání, vyšší rozpustnost, stabilita či lepší absorpční vlastnosti. Chelatační činidla, jež se účastní tvorby chalátů, jsou přirozená a syntetická. Mezi přirozené patří chlorofyl (chelát hořčíku) a hemoglobin (chelát železa). Chelatační vlastnosti mají nejen aminokyseliny, ale i proteináty (směsi volných aminokyselin s krátkými řetězci proteinů) a organické kyseliny (kyselina jantarová, vinná, citronová aj.). Například kyselina citronová je vhodná k chelataci železa. Mezi syntetická chelatační činidla se řadí např. EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), NTA (kyselina nitrilotrioctová), EGTA (ethylenglykoltetraoctová kyselina), DTPA (kyselina diethylentriaminpentaoctová). Činidla jsou uplatňována v zemědělství (hnojiva, extrakce kovů) nebo i v lékařství. V lidském těle mohou ovlivňovat farmakokinetiku i farmakodynamiku chelatované léčivé látky, tedy její účinek (Okáčová et al., 2011; Naghipour et al., 2016). Cheláty jsou využívány k detoxikaci toxických prvků v organismu a mohou být použity ke zlepšení stavu některých onemocnění (např. kardiovaskulární). Důležité je jejich správné použití. S chelatačními činidly je dobře vázán např. zinek, měď, hořčík, vápník. Substrátem pro cheláty jsou např. i peptidy metallothionein a glutathion (Figueira et al., 2001; Sears, 2013).

2.1.4 Nanočástice

Pojem nanotechnologie je odvozen od slov *nanos* neboli trpaslík a *techné* neboli dovednost či zkušenost. Tento obor se zabývá objekty o velikostech v řádu nanometrů, což je 1 – 100 nm (10^{-9} m). Na obrázku 1 jsou vyobrazeny nanočástice zinku. Dle Fojtíka (2014) jsou nanotechnologie interdisciplinární vědeckou oblastí, zabývající se stavbou a inženýrstvím molekulárních objektů hmoty (nanomateriálů). Dále je využíváno jejich unikátních vlastností v různých výzkumech, ale i v praxi. Je využíváno optických, elektrických, magnetických vlastností, interakcí s jinými strukturami a soubory molekul, jako zdroj optického záření, k záznamu informací. Nanotechnologií je využíváno i v medicíně a biologii jako elektormagnetický ventil k nekrotizaci nádorů, k vychytávání HIV virů či jako dopravníky a nosiče léků v biologických systémech.



Obrázek 1: *Nanočástice zinku pod mikroskopem (Wang et al., 2016; upraveno).*
Na obrázku a je zvětšení 100 nm, na obrázku b zvětšení 20 nm.

Ve výzkumech je využíváno kvantových teček, fluoreskujících polovodičových nanokrystalů. Ty jsou schopny měnit s velikostí vlnovou délku vyzařovaného světla. Kvantové tečky jsou používány ve velikosti 1 – 20 nm, příkladem je sulfid zinečnatý, který má nízkou toxicitu a vykazuje pozoruhodné vlastnosti. Nanočástice je možné využívat při zobrazování nádorových buněk (Balvan et al., 2014; Nejdl et al., 2013). Z experimetnu Horký et al. (2016) je zřejmé, že použití selenových nanočástic v organismu zvířat zvyšuje koncentraci selenu i antioxidační aktivitu.

2.1.5 Zinek v organismu

2.1.5.1 Význam zinku

Zinek je obsažen v tělech všech organismů a je součástí více než 200 metaloenzymů. V některých molekulách plní katalytickou funkci, u jiných je třeba k fixaci prostorové struktury molekul, například u bílkovinných transkripčních modulátorů (zinkové prsty) se specifickou vazbou k určitým úsekům DNA. Mezi enzymy, ve kterých je obsažen zinek, patří alkoholdehydrogenáza, alkalická fosfatáza, kolagenáza, laktátdehydrogenáza, superoxiddismutáza, karboxypeptidáza, dipeptidáza atd. Kyselina fytová v potravě snižuje resorpci nejen zinku, ale i hořčíku a železa (Velíšek, Hajšlová, 2009; Underwood, Suttle, 1999).

Jeho přítomnost je nezbytná pro správný růst a vývoj organismu a také pro řadu enzymatických pochodů. Zinek v těle hraje zásadní roli v enzymech, metaloproteinech a také se účastní genové exprese. Enzymy a proteiny jsou důležité při mitotickém buněčném dělení a diferenciaci, ale také při syntéze proteinů a nukleových kyselin.

Je významnou složkou pro metabolismus bílkovin, sacharidů, tuků a acidobazickou rovnováhu (Kenšová et al., 2014; Kasper, 2015).

Zinek se také účastní tvorby inzulinu. Bylo zjištěno, že homeostáza zinku v organismu má vliv na pankreatické β-buňky, které tento hormon produkují. Inzulin je hormon slinivky břišní, snižující množství hladiny cukru v krvi. Je-li v těle nedostatek zinku, může to mít vliv i na rozvoj cukrovky. Dále má zinek antioxidační účinek, snižuje riziko lipoperoxidace stabilizací buněčných membrán. Snižuje také toxické účinky olova a kadmia, má tedy i detoxikační účinek (Tvrzník, Zeman, 2005; Nygaard et al., 2014).

Intracelulární zinek je regulován transportéry a zinkovými vazbami na bílkoviny (např. metalothionenin), jejichž součástí je metylace DNA, čímž je podporována efektivní imunitní odpověď (Kessels et al., 2016). V experimetnu od Prasad (2008) bylo zjištěno, že obsah zinku v organismu má opravdu velký význam pro imunitní systém. Po suplementaci zinkem byl také snížen oxidační stres. Zinek je pomocníkem při léčení virových onemocnění, nachlazení či rýmě. Nutným je také při syntéze bílkovin a pomáhá odstraňovat poruchy potence mužů. S vitaminem E je používán k léčbě neplodnosti. Významným je také při léčbě schizofrenie, mentálních poruch, k úpravě nepravidelné menstruace, ke zlepšení stavu kůže, vlasů, nehtů či k léčení akné atd. (Jordán, Hemzalová, 2001).

2.1.5.2 Metabolismus zinku

Zinek je vstřebáván v tenkém střevě, především ve dvanáctníku. Vstřebávání zinku v trávicím ústrojí je regulováno převážně buňkami střevní sliznice. V buňkách se zinek nachází převážně v cytosolu. Do střevních buněk je transportován pomocí přenašeče dvojmocných kationtů (jako u železa). V buňkách střevní sliznice může být zinek vázán dvěma způsoby. Je-li zinek podáván ve vysokých dávkách stravou, pak je vázán v metallothioneinu. Při nižších dávkách je vázán v komplexu s bílkovinou CRIP (*Cysteine Rich Intestinal Protein*). Vstřebaný zinek dále putuje do jater, sleziny, slinivky. Tím je vytvořena jeho mobilizovatelná rezerva, která není příliš velká. V krvi je zinek vázán hlavně v plazmě (75 %) na bílkovinách, erytrocytech (22 %) a nejméně na leukocytech (3 %) (Zeman et al., 2004; Racek et al., 2006; Velíšek, Hajšlová, 2009).

Resorpce minerálních látek a stopových prvků je různá. Je závislá na chemické formě, složení stravy, fyziologických podmínkách organismu a také na výši příjmu.

Míra vstřebávání zinku je asi 20 – 40 %. U jedinců s nižší tělesnou hmotností, v období růstu, těhotenství, laktace a také při nižším obsahu zinku v těle, se tento minerální prvek vstřebává více. Ve stáří a při chorobách (převážně gastrointestinálního traktu) se resorpce naopak snižuje. Pokud jsou však podávány vysoké dávky zinku, pak je účinnost vstřebávání také nižší. Vyšší příjem bílkovin a aminokyselin ve stravě resorpci zvyšuje, naopak kyselina fytová a vláknina ji snižují (Velíšek, Hajšlová, 2009; Stránský, Ryšavá, 2014). Je-li vysoký obsah fytátů, pak vznikají nevyužitelné komplexy. Negativní vliv na absorpci zinku mají i oxaláty, taniny či nadbytek mědi a železa (Tvrzník, Zeman, 2005).

Tabulka 1: *Obsah zinku v potravinách živočišného a rostlinného původu v mg na 100 g potraviny (Dastych, 2004; upraveno).*

Produkty		**Obsah zinku (mg/100 g)**
Živočišné	ústřice	79,0
	hovězí maso	6,4
	hovězí játra	5,5
	krab	4,6
	sýr	4,0
	telecí maso	3,9
	vepřové maso	3,8
	vaječný žloutek	1,2
	drůbeží maso	1,1 – 2,8
	tuňák či treska	1,1
	mléko	0,3
Rostlinné	hrách syrový/vařený	3,2/1,0
	ovesné vločky	3,0
	ořechy a luštěniny	2,7
	žitný chléb	1,3
	rýže	0,7
	bílý chléb	0,6
	mrkev	0,3
	brambory	0,3
	jablečný či pomerančový džus	0,1
	čaj/káva	0,02/0,03

Vstřebávání zinku ovlivňuje i nadměrný příjem fosfátů. Negativní vliv fytátů ve stravě se dá velmi dobře ovlivnit kynutím těsta, máčením semen a nakličováním (Juříková, 2013). Zinek je vylučován především stolicí a kůží. Celkové ztráty v průměru činí u mužů 2,2 mg/den a u žen 1,6 mg/den (Komprda, 2003).

Celkový obsah zinku v těle dospělého člověka se pohybuje v rozmezí 1,5 – 3,0 g a platí, že vyšší průměrný obsah mají, oproti ženám, muži (Schmidová, 2008). V těle se zinek vyskytuje především v kůži, vlasech, nehtech, očích, kostech, játrech, ledvinách, slezině a ve varlatech (Komprda, 2003). Více než 95 % se vyskytuje intracelulárně. V kosterních svalech je obsaženo přibližně 60 % celkového obsahu zinku v těle, v kostech okolo 30 %. V krvi je obsaženo kolem 6 – 7 mg/l zinku (Schmidová, 2008).

2.1.5.3 Příjem zinku potravou

Obecně je biologická využitelnost zinku vyšší u potravin živočišného původu. Vhodnými zdroji zinku jsou maso hovězí, vepřové a drůbeží (1 – 4 mg/100 g), játra (1 – 11 mg/100 g), mléko (4 mg/l), mléčné výrobky (2 – 4 mg/100 g), luštěniny (2 – 6 mg/100 g) (Komprda, 2003). Mezi nejvíce bohaté zdroje zinku se řadí čerstvé ústřice a škeble. Potřeba zinku stoupá v těhotenství, při kojení, cukrovce a také při zvýšené tělsené námaze (Mach, 2012). V tabulce 1 je možné vidět množství zinku v některých potravinách živočišného a rostlinného původu.

2.1.5.4 Potřeba zinku

Doporučený denní příjem je udáván pro muže 10 mg/den a ženy 7 mg/den. Během těhotenství je nutné zvýšit příjem o 3 mg/den a v období laktace o 4 mg/den (Komprda, 2003). Doporučený denní příjem dle věkových kategorií a pohlaví lze vidět v tabulce 2. Je z ní zřejmé, že se zvyšujícícm se věkem se jeho potřeba zvyšuje. Horní tolerovatelná hodnota příjmu zinku je 25 mg denně, která byla stanovena Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) (Winklerová, 2014).

Účinnost, průměrně 30 %, je ovlivněna aktuální potřebou zinku, stupněm zabezpečení organismu zinkem, tělesnou hmotností (nižší tělesná hmotnost znamená vyšší účinnost absorpce) a způsobem chemické vazby zinku v potravinách (Komprda, 2003). Zvýšený příjem zinku by se měl být zajištěn po těžkých operacích při rekonvalescenci, při dermatologických, infekčních a nádorových chorobách. Také při léčbě diuretiky, enterální, parentální výživě, stresových situacích, speciálních

dietách, vrozených metabolických poruchách, malnutrici atd. (Tvrzník, Zeman, 2005). Na dostatečný příjem zinku by měli dát pozor nejen těhotné a kojící ženy, ale i starší lidé či vegetariáni. Se zvyšujícím se věkem je sníženo vstřebávání minerálních látek, proto je potřeba zinku vyšší. Často je ve stáří chybějícím prvkem nejen zinek, ale i železo, vápník a jód (Reihserová, 2014). Výsledky studie od Adriani, Wirjatmadi (2014) naznačují, že je-li u malých dětí dostatečný příjem vitaminu A a zinku, dochází ke snížení rizika infekcí a k zvýšení jejich skeletárního růstu. Holandští vědci zjistili, že podáváním zinku a kyseliny listové se zvýšil počet aktivních spermií v semeni až o 74 % (Mach, 2012).

Za významné množství zinku, jež se uvádí na obalech potravin, je 15% denní referenční hodnota příjmu, tj. 1,5 mg/den. Maximální přípustné množství v doplňcích stravy pro dospělou populaci je 15 mg/den (Winklerová, 2014). Jako zdroj zinku pro doplňky stravy lze používat pouze formy uvedené v Nařízení Komise (ES) č. 1170/2009, v aktuálním znění: octan, L-askorbát, L-aspartát, bisglycinát, chlorid, citrát, glukonan, mléčnan, L-lysinát, jablečnan, mono-L-methionin, oxid, uhličitan, L-pyroglutaman (pidolát), pikolinát a síran zinečnatý.

Tabulka 2: *Množství doporučeného denního příjmu zinku v mg/den (Stránský, Ryšavá; 2014; upraveno).*

Věk	Muži (mg/den)	Ženy (mg/den)
kojenci		
0 – 3 měsíce	1,0	1,0
4 – 11 měsíců	2,0	2,0
děti		
1 – 3 roky	3,0	3,0
4 – 6 let	5,0	5,0
7 – 9 let	7,0	7,0
10 – 12 let	9,0	7,0
13 – 14 let	9,5	7,0
mladiství a dospělí	**10,0**	**7,0**
těhotné a kojící ženy		**10,0 – 11,0**

2.1.5.5 Nedostatek zinku

Klinický nedostatek zinku byl poprvé diagnostikován v roce 1960 (Tvrzník, Zeman, 2005). Nedostatek zinku se projevuje ztrátou chuti k jídlu, dermatitidami, vypadáváním

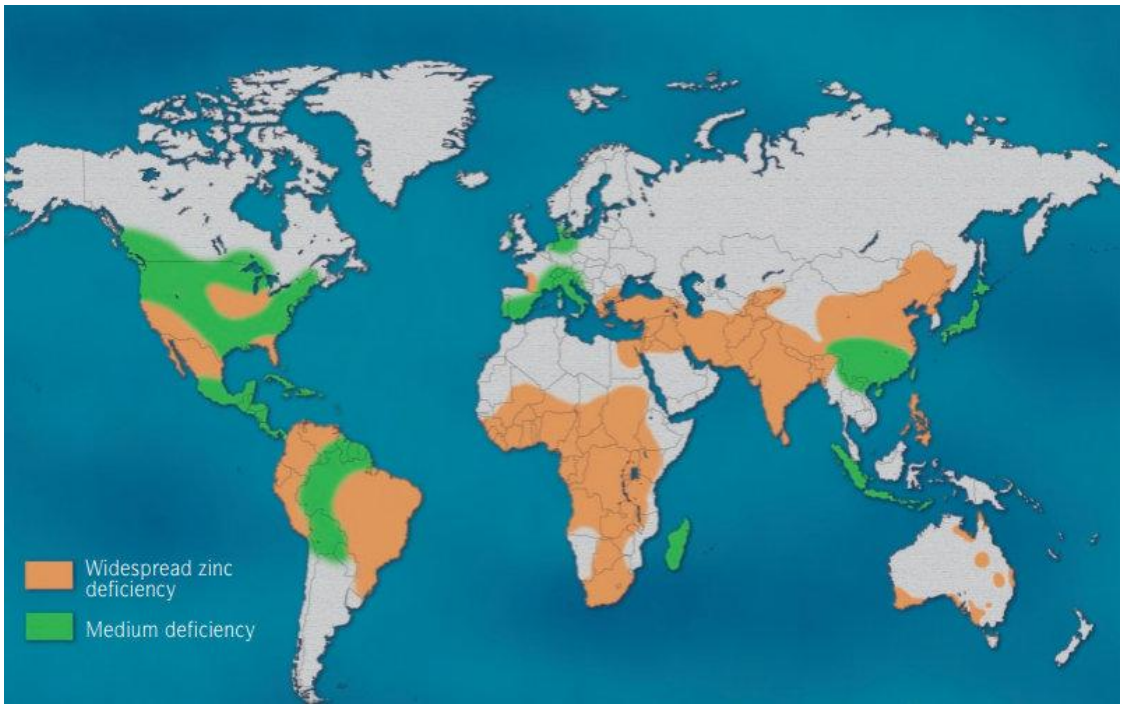
vlasů, neuropsychickými potížemi, depresí růstu, poškozením činnosti pohlavních orgánů, poškozením funkcí imunitního systému (Komprda, 2003).

Konkrétněji to může být zvětšená prostata, neplodnost, opožděné dospívání, menstruační poruchy, náchylnost k infekcím, pomalé hojení ran, bolesti kloubů, ateroskleróza, poruchy oběhu krve, duševní zpozdilost, bílé skvrny na nehtech, alergie, akné a oční choroby. V krajních případech může dojít až k smrti jedince (Mach, 2012; Kenšová et al., 2014). Dle experimentu bylo zjištěno, že nedostatek zinku ve stravě v mladém věku zhoršuje i prostorovou paměť (Kida et al., 2015). Jelikož zinek hraje důležitou roli v metabolismu kostí, pak jeho nedostatkem může docházet ke vzniku osteoporózy. Experimentem bylo zjištěno, že při nedostatku zinku se snížila jak tělesná hmotnost, tak koncentrace zinku v plazmě a stehenní kosti (Eberle et al., 1999).

Příjem zinku souvisí s konzumací bílkovin. Ohroženou skupinou jsou tedy lidé s nedostatečným příjmem masa či vegetariáni, ale také lidé chudší a starší. Příčinou nedosatku zinku může být také porucha vstřebávání, stres, alkoholismus, chronická onemocnění, trauma atd. (Lutz, Przytulski, 2011). Zinek je také nezbytným prvkem pro normální vývoj plodu. Jeho nedostatek během těhotenství tak může způsobit více těhotenských potíží, předčasný porod či nižší porodní váhu dítěte. Je-li nedostatečné množství zinku v období vývoje mozku plodu, pak může dojít k jeho poškození (Swinneyová, Andersonová, 2011).

První dokumentovaný deficit zinku byl pozorován v Egytě a Íránu, kde převažuje právě rostlinná strava. Ta je bohatá na fytáty, které snižují absorpci zinku (McGuire, Beerman, 2013). Na obrázku 2 je vyznačen deficit zinku ve světě. V ČR byla zjištěna lehká deficience zinku (Tvrzník, Zeman, 2005). Nedostatek zinku se převážně vyskytuje u lidí žijících v tropických a subtropických oblastech. V těchto zemích je konzumace živočišných potravin (zejména masa) nízká. Jejich strava je založena převážně na obilných výrobcích. Dalším důvodem sníženého vstřebávání zinku, může být skutečnost, že se lidé v tropických oblastech více potí a tedy dochází k jeho ztrátám právě potem. Následkem nedostatečného přísunu této minerální látky, jež ovlivňuje příslušné hormony, je opožděná puberta. Z tohoto důvodu mohou muži kolem dvacátého roku svého života stále vykazovat pubertální chování (Bender, 2014; Kasper, 2015).

Nejvyšší nedostatek zinku u dětí mladších pěti let byl pozorován zejména v Africe, ve východním Středomoří a v jihovýchodní Asii. Nedostatek zinku způsoboval převážně průjem, zápal plic a malárii. Příčinou nedostatku tohoto prvku je pravděpodobně nedostatečný příjem potravin obsahujících zinek a nesprávně zvolená strava (příjem nadměrného množství inhibitorů zinku). V rozvojových zemích také není populace dostatečně informována o této problematice jako ve vyspělejších státech (Ezzati et al., 2004).



Obrázek 2: *Mapa nedostatečného příjmu zinku ve světě (Alloway, 2008; upraveno). Oranžově je znázorněn vysoký deficit zinku, zeleně střední deficit zinku.*

2.1.5.6 Toxicita zinku

Dávka, která vyvolá akutní toxicitu, je 2 g. Projevuje se poruchami trávicího traktu a krevního obrazu. Rizikový chronický příjem je nad 30 mg/den. Příznaky jsou nevolnost, zvracení, průjem a další gastrointestinální potíže. Při chronickém příjmu může být porušena utilizace mědi, což může vést k anémii. Příčinou toxicity mohou být pozinkované nádoby, v nichž jsou uchovávány potraviny při kyselém pH. Nebo také příjem kontaminované pitné vody (migrace z potrubí) či neuvážený příjem příslušných potravních doplňků (Komprda, 2003; Kasper, 2015; Stránský, Ryšavá, 2014).

Jelikož vyšší hladiny zinečnatých iontů působí toxicky, je nutná přesná regulace jejich hladiny. Na té se mohou podílet zinkové přenašeče a zinek vázající proteiny, zejména metallothioneiny. Nerovnováha obsahu zinku v organismu je spojena také

s nádorovým onemocněním hlavy, krku, prsu, prostaty, jater či rakoviny plic. Zjišťování množství zinečnatých iontů tak může být použito k diagnostice těchto onemocnění (Gumulec et al., 2010; Hraběta et al., 2016).

2.2 Volné radikály

Kyslík se do atmosféry dostal díky řasám, které rozložily vodu. Nejprve tvořil pouhé 1 % v atmosféře a postupně se dostal na dnešních 21 %, asi před pěti miliony let (Papas, 2001). Volné kyslíkové radikály jsou atomy, molekuly nebo ionty. Tyto látky mají v elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Vzniknou ztrátou, nebo přijetím elektronu, případně homolytickým štěpením ($A - B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$) na 2 částice, kdy má každá po jednom elektronu. K homolytickému štěpení je potřeba hodně energie, což je prakticky nemožné v biologických systémech. Volné radikály jsou často málo stabilní a vysoce reaktivní právě proto, že se snaží doplnit chybějící elektron s cílem stabilní konfigurace. Elektron je získáván odtržením z jiné molekuly. Poté dochází k řetězové reakci, neboť z molekuly se stane radikál, který opět napadá další sloučeniny. Reakce je ukončena, potkají-li se dva radikály, nebo radikál s látkou, která má stabilní radikál. Řetězová reakce se tedy skládá ze tří fází: iniciace, propagace a terminace (Müllerová et al., 2014). Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly. Přetrvávají pouze v řádu $10^{-9} - 10^{-12}$, proto jsou schopny nezávisle existovat po velmi krátkou dobu, než se srazí s další molekulou, které odeberou nebo předají elektron. Z další molekuly se tak stává radikál (Papas, 2001; Murray et al., 2012).

Volné radikály se řadí mezi signální molekuly, naše tělo je potřebuje a umí je využívat. Denně vznikají mitochondriálním dýcháním. Volné radikály tedy produkují hlavně mitochondrie, jež obsahují i vlastní mtDNA a jsou tak zároveň cílem oxidačního poškození (Mandelker, 2009). Volné radikály se účastní syntézy významných látek, jako jsou bílkoviny, hormony, nukleové kyseliny. Jsou také součástí bílých krvinek, pomáhají remodelovat kost či oplodnit vajíčka (Kastnerová, 2012).

Mezi další příznivé účinky volných radikálů patří pomoc při zabíjení fagocytovaných mikroorganismů (např. kyselina chlorná), při biosyntéze a katabolismu cholesterolu, při detoxikaci různých xenobiotik či léků (např. hydroxylový radikál), k narušení membrány vajíčka pro spermie (např. superoxid), k zabránění proniknutí spermií do vajíčka po oplodnění (např. peroxid vodíku), pro štítnou žlázu k oxidaci jodidu na elementární jód. Oxid dusnatý má oproti superoxidu vasodilatační efekt

(roztažení cévní stěny), reguluje imunitní pochody, účastní se erekce a je neurotransmiter (Racek, 2003; Müllerová et al., 2014).

Endogenní příčinou vzniku volných radikálů je většinou probíhající metabolismus. Další příčinou může být oxidace hemoglobinu na methemoglobin, vznik kyseliny močové (úrazy, nekrózy, pooperační stavy), rozpady fagocytů a makrofágů při zánětech či popáleninách, hyperglykémie, svalový výkon na „kyslíkový dluh" atd. Mezi příčiny vzniku volných radikálů z vnějšího prostředí patří: ionizující záření (záření z jaderného reaktoru, rentgenové záření), UV − světlo, škodliviny ze vzduchu, cigaretový kouř (jedna vykouřená cigareta může zatížit organismus cca 10^{17} volných radikálů), dále intoxikace, ale i vliv světla či potrava po tepelné úpravě (Navrátil et al., 2008; Müllerová et al., 2014). I tepelnou úpravou jedlých olejů, dochází ke snížení obsahu antioxidantů (karotenoidů, vitaminů, fenolických látek) a zvýšení množství volných radikálů. K zabránění vzniku toxických produktů je doporučována tepelná úprava za nízké teploty po krátkou dobu (Falade et al., 2017)

Volnými radikály v těle jsou většinou deriváty kyslíku, tzv. reaktivní sloučeniny kyslíku ROS (*reactive oxygen species*) a deriváty dusíku, tzv. reaktivní sloučeniny dusíku RNS (*reactive nitrogen species*). Nazývají se volnými radikály proto, že obsahují nepárové elektrony a jsou schopny nezávisle existovat (Mandelker, 2009). Známými radikály, které mohou být za daných situacích pro tělo nebezpečné, jsou superoxidový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, hypochlorová kyselina, peroxylový radikál, oxid dusnatý, peroxynitrit ad. (Mandelker, 2009; Murray et al., 2012). Vůbec prvním objeveným radikálem byl trifenylmethyl radikál. A to v roce 1900 panem Gombergem (Chatgilialogu, Studer, 2012).

2.2.1 Superoxidový radikál

Superoxidový radikál vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku, patří mezi nejčastěji se objevující radikál v živých organismech a je odstraňován enzymem superoxiddismutáza (SOD). Tvoří se během různých enzymových reakcí náhodně či cíleně. Enzymy (SOD, kataláza, peroxidázy), jež produkují superoxid a vyžadují ho, se nachází v peroxizomech. V červených krvinkách vzniká superoxid při autooxidaci hemoglobinu na methemoglobin. Reakcí superoxidu a vody vzniká kyslík a peroxid vodíku. Nebezpečné je, že z tohoto volného radikálu vznikají mnohem reaktivnější formy kyslíku. A to peroxid vodíku, hydroxylový radikál, peroxynitrit nebo i kyselina

chlorná. Nejúčinnější je chránit organismus již před superoxidovým radikálem. Ostatní radikály likviduje organismus obtížněji, neboť jejich doba existence je velmi krátká (Racek, 2003; Murray et al., 2012; Müllerová et al., 2014).

2.2.2 Hydroxylový radikál

Mezi nejnebezpečnější radikál z ROS patří radikál hydroxylový. Hydroxylový radikál má tak krátký biologický poločas, že neexistuje účinný mechanismus, kterým by byl odstraněn. Zúčastňuje se také poškozování dusíkatých bází. (Racek, 2003; Müllerová et al., 2014). Dalším z ROS je peroxid vodíku. Nepatří mezi volné radíkály a je sám o sobě celkem nereaktivní. Avšak rychle reaguje s redukovanými přechodnými kovy (železo, měď) za vzniku Fentonovy reakce ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$). Tou dochází k tvorbě toxického hydroxylového radikálu. Peroxid vodíku je ostraňován katalázou a peroxidázami (Racek, 2003; Kalousová, 2006; Müllerová et al., 2014).

Tabulka 3: *Reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) (Kalousová, 2006; upraveno). Tučně jsou vyznačeny radikály.*

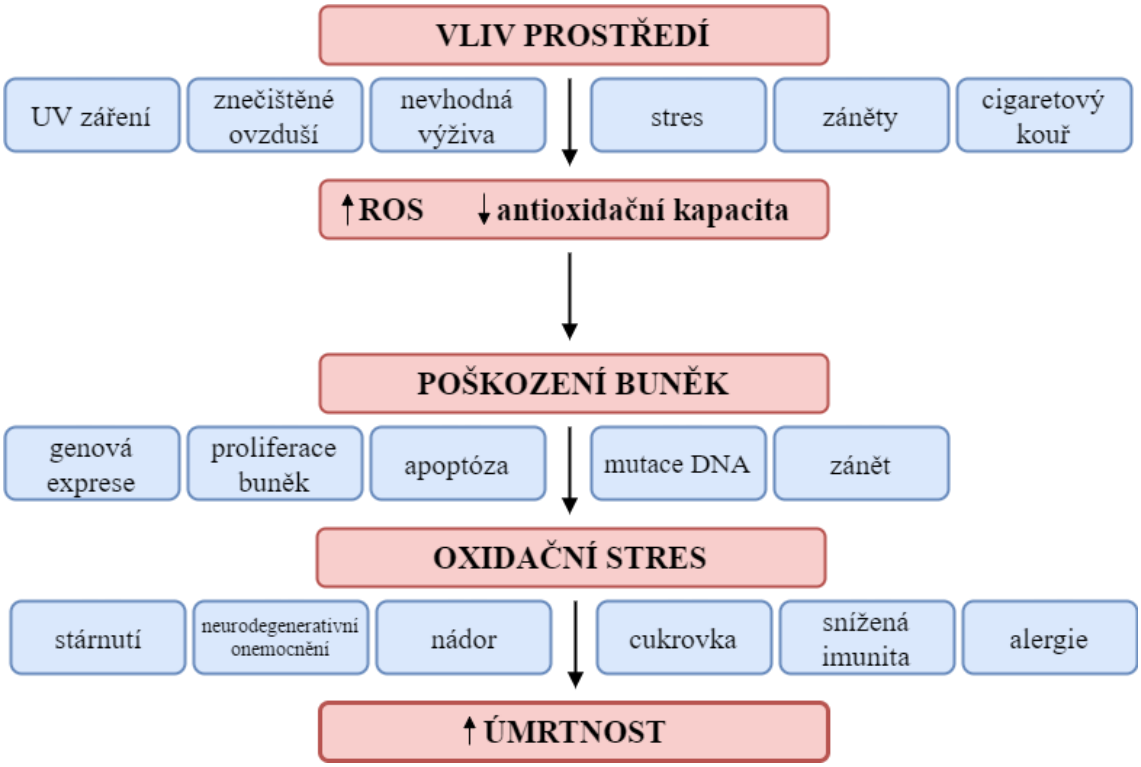
ROS	RNS
superoxid	**oxid dusnatý**
hydroperoxyl	**oxid dusičitý**
hydroxylový radikál	nitrosonium
peroxyl	nitroxyl
alkoxyl	kyselina dusitá
peroxid vodíku	oxid dusitý
kyselina chlorná	oxid dusičitý
ozón	nitronium
singletový kyslík	peroxynitrit
	alkylperoxynitrit

Mezi další zástupce ROS se řadí singletový kyslík, peroxyl, alkoxyl či ozón. Singletový kyslík na sebe mohou vázat nejen vitaminy C, E a β-karoten, ale i aminokyseliny histidin a tryptofan. Další reaktivní formou je forma chlóru, tedy například kyselina chlorná. Reaktivními formami dusíku (RNS) jsou oxid dusnatý, oxid dusičitý, peroxydusitan, nitrosyl, kyselina dusitá, oxid dusitý a alkylperoxinitrit. Mezi další volné radikály se řadí atomy přechodných kovů: železo, měď, nikl, zinek, mangan, titan atd. (Racek, 2003; Müllerová et al., 2014). V Tabulce 3 jsou zástupci ROS a RNS.

2.3 Oxidační stres

Oxidační stres je převaha produkce ROS nad antioxidační ochranou tkání. Bez radikálových reakcí by však nebyl život, dojde-li však k dysregulaci, dochází k patologickým dějům (Vítek, 2009). Je-li tedy volných radikálů více, než je potřeba buněk (a nejsou ani zablokovány), mohou mít škodlivé účinky. Volné radikály nejprve napadají buněčný obal, dále ničí komunikaci mezi buňkami a ničí schopnost transportu látek mezi buňkami. Proto dochází k mutacím DNA, zvyšování rizik vzniku nádorů, aterosklerózy, cukrovky, urychlení stárnutí, oslabení organismu. Oxidační stres se tedy podílí také na vzniku Alzheimerovy nemoci či demence. Je-li v krvi dostatek antioxidantů, snižuje se výskyt onemocnění asi o 40 % (Hettiarachchy et al., 2012; Kastnerová, 2012; Jopp, 2014). Antioxidanty jsou látky, jež brání oxidačním procesům, které mohou způsobovat právě kardiovaskulární, nádorové onemocnění či další chronické nemoci (Willcox et al., 2004).

Následkem oxidačního stresu může být způsobena buněčná smrt, která způsobí nevratné poškození organismu. Chemická modifikace aminokyselin v proteinech způsobí to, že imunitní systém tyto látky rozpozná jako tělu cizí, pak může docházet k rozvoji autoimunitních onemocnění (Murray et al., 2012). Volné radikály poškozují mastné kyseliny. Proces poškozování lipidů se nazývá lipoperoxidace. K poškození dochází spíše u polyenových mastných kyselin, ze kterých mohou vznikat až toxicky a mutagenně působící aldehydy (Racek, 2003; Mandelker, 2009). Například při fritování, za použití rostlinných olejů, dochází k autooxidaci a následnému vzniku chemicky velmi aktivních a škodlivých látek, jako jsou peroxidy, hydroperoxidy, aldehydy, ketony atd. (Svačina et al., 2013). Volné radikály tedy útočí na nenasycené mastné kyseliny v lipidech, kde je způsobena ztráta dvojných vazeb či tvorba reaktivních metabolitů. Další napadenou strukturou jsou proteiny. U nich dochází k poškozování agregace a síťování, štěpení, reakci s hemovým železem, modifikaci benzenových jader aminokyselin atd. Výsledkem je tedy poškozena aktivita enzymů a transport iontů. Volné radikály ničí také strukturu DNA. Je způsobeno štěpení deoxyribózy, modifikaci a poškození bází, zlomům řetězců. Následkem jsou mutace, translační chyby či inhibice proteosyntézy (Štípek, 2000).



Obrázek 3: *Vznik oxidačního stresu (Maciejczyk et al., 2017; upraveno).*
Působením vnitřních a vnějších faktorů prostředí dojde ke zvýšení ROS (reaktivní kyslíkaté částice). Je-li snížená antioxidační kapacita, dojde k porušení rovnováhy mezi antioxidanty a volnými radikály. Dojde následně k poškozování buněk a následkem buněčného stresu vznikají různá onemocnění, která zvyšují úmrtnost.

Jako ochrana proti poškování buněk slouží antioxidační mechanismy. Antioxidanty neutralizují volné radikály a udržují tak rovnovážný stav v organismu (Kastnerová, 2012). Nejvhodnějším stavem je rovnováha mezi antioxidanty a volnými radikály. Je-li v organismu převaha volných radikálů, vzniká oxidační stres. Převažují-li v organismu antioxidanty, může docházet k blokacím příznivých účinků volných radikálů a tvorbě oxidačního stresu. Přebytek antioxidantů tak může paradoxně zvyšovat oxidační stres (Racek, 2003; Müllerová et al., 2014). Na obrázku 3 je znázorněno, jak oxidační stres vzniká.

2.4 Antioxidanty

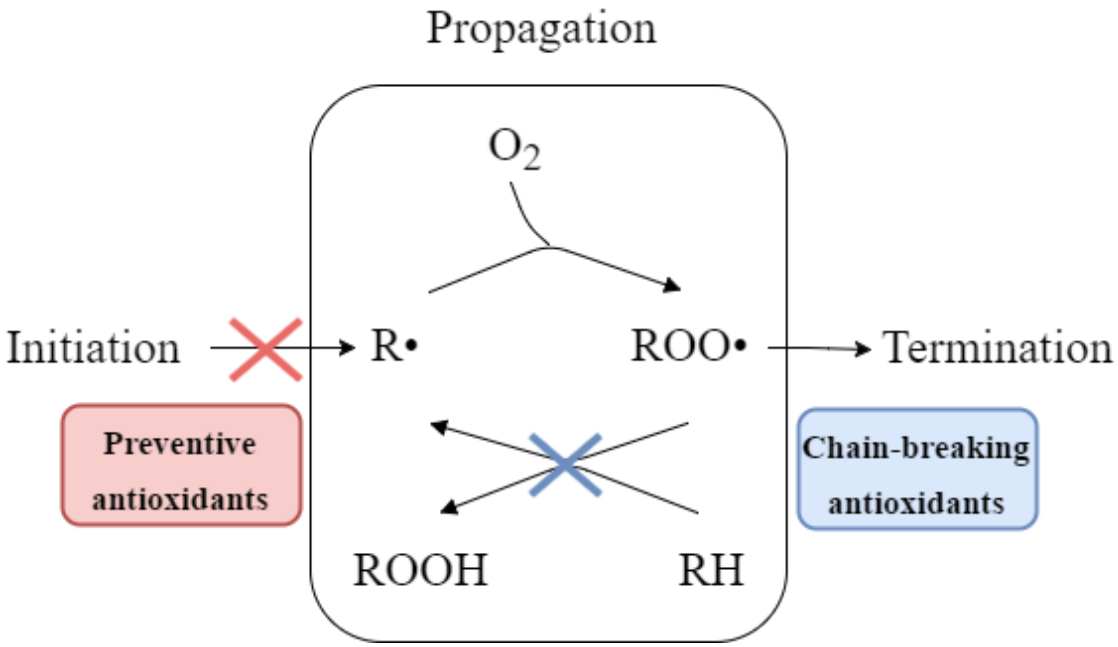
Antioxidanty převádějí volné radikály na nereaktivní či méně reaktivní formy. Antioxidanty ve formě enzymů a koenzymů si naše tělo dokáže vytvořit samo. Ostatní, tedy esenciální antioxidanty, se musí tělu dodat. Patří mezi ně vitaminy a různé biologicky aktivní látky. Některé minerální látky jsou součástí složek antioxidačních enzymů, které si tělo vytváří. Každý antioxidant je účinný na jiný volný radikál. Velké

množství antioxidantů se nachází v ovoci a zelenině. Antioxidanty se také využívají při konzervaci v potravinářském a kosmetickém průmyslu (Kastnerová, 2012; Manohar et al., 2017). Mezi významné antioxidanty se řadí antioxidační enzymy, glutathion, vitaminy, stopové prvky (např. selen, zinek), albumin, transferin, metallothionein, kyselina močová, flavonoidy, ubichinol aj. (Rahal et al., 2014). Celkovou antioxidační kapacitu TAA (*Total Antioxidant Activity*) vzorků lze také různými metodami měřit (Mareček et al., 2011).

Dle Müllerové et al. (2014) se antioxidační ochranný systém dělí na tři typy. Prvním jsou mechanismy, které brání vyšší tvorbě volných radikálů; druhým typem jsou mechanismy, jež zachytí a odstraní vzniklé radikály (tzv. vychytávače, lapače, zhášeče); třetím typem jsou mechanismy reparační, odstraňující již poškozené biomolekuly. Antioxidantny se dle původu dělí na endogenní a exogenní, ty se dále dělí na přirozené (vitaminy) a umělé (léky).

Tvorba radikálů má tři fáze. Iniciaci, při níž se volné radikály tvoří. Při propagaci dochází k napadání substrátů a tedy tvorbě dalších volných radikálů. Poslední fází je terminace, kdy se reakce ukončuje spojením či zánikem radikálů. Chatgilialogu, Studer (2012) dělí antioxidanty na přímé a nepřímé. Přímo působí preventivní antioxidanty (*Preventive antioxidants*), zpomalující či zastavující tvorbu volných radikálů (např. enzym kataláza, EDTA, UV filtry – např. oxid zinečnatý). Dále antioxidanty (*Chain-breaking antioxidants*, např. vitaminy E a C, flavonoidy) mohou reagovat s radikály dříve, než napadnou další substráty (viz obr. 4).

Přestože každý antioxidant neutralizuje jiný volný radikál, všechny antioxidanty vzájemně spolupracují jako síť. Čím je síť hustší, tím lépe může fungovat. Např. vitamin C nejlépe funguje v cytoplazmě, vitamin E v lipidech, proteiny vážou a oddělují oxidační kovy (Papas, 2001; Jopp, 2014). Mezi hlavní antioxidační enzymy patří kataláza, glutathionperoxidáza (GPx) a superoxiddismutáza (SOD). V aktivním centru obsahují přechodné kovy: selen, zinek, mangan, měď a železo. Tyto enzymy jsou uvnitř buněk a jsou schopny volné radikály vyloučit a odstranit. Tak zajišťují buněčnou rovnováhu. Ta je porušena tehdy, je-li v buňkách přebytek volných radikálů nebo nedostatek antioxidantů (Mandelker, 2009; Müllerová et al., 2014).



Obrázek 4: *Působení antioxidantů proti volným radikálům. (Chatgilialogu, Studer, 2012; upraveno). Na obrázku je znázorněn mechanismus, kterým antioxidanty zasahují do procesu autoxidace (peroxidace) s volnými radikály. Vzniklý R• reaguje s kyslíkem za vzniku ROO•, který propaguje řetězovou reakci peroxidace lipidů. Preventive antioxidants zasahují do procesu iniciace, zpomalují nebo zastavují počáteční tvorbu radikálů. Chain-breaking antioxidants zasahují do propagační fáze autoxidace, reagují s ROO•dříve, než napadne další substrát a spustí se řetězová reakce. [RH (substrát, např. lipid), ROOH (hydroperoxid), O_2 (kyslík), R• (alkylový radikál), ROO• (peroxylový radikál); 3 fáze vzniku radikálů: iniciace, propagace, terminace]*

Mezi antioxidanty dále patří vitaminy skupiny B, A, C a E, koenzym Q_{10}, α-lipoová kyselina, glutamin, methionin, fosfolipidy, ginko biloba, ostropestřec mariánský, extrakt ze zeleného čaje či semínek hroznů (Mandelker, 2009). V rybím tuku se nacházejí také významné antioxidanty, jsou to EPA (kyselina eikosapentaneová) a DHA (kyselina dokosahexaenová) Antioxidačně působí také proteiny vázající kovy, jako jsou transferin či ceruloplazmin. Dále glutathion, bilirubin a kyselina močová (Silbernagl, Lang, 2012; Kim, 2013). Žlučové barvivo bilirubin zabraňuje oxidaci mastných kyselin, proteinů a také lipoproteinů o nízké hustotě. Je schopný pohlcovat singletní kyslík, peroxylové radikály i superoxidový anion. V přítomnosti peroxidu vodíku a organických hydroxyperoxidů slouží jako substrát peroxidáz (Vítek, 2009).

Jedním z výživových doporučení je tedy i zvýšení příjmu ochranných látek. Mezi ně se řadí minerální látky, vitaminy a další přírodní živiny (zejména zinek, selen, vápník, jod, karoteny, vitamin E, ochranné látky obsažené v zelenině aj.), zajišťující odpovídající antioxidační aktivitu a jiné ochranné procesy v organismu (Dostálová, Kadlec, 2014).

2.4.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou přirozeně se vyskytující složkou potravin, jako účinné antioxidanty působí fenolické monomery a flavonoidy. K nim se řadí látky odvozené od kyseliny skořicové a kyseliny hydroxybenzoové. Konkrétně to jsou kyselina kávová (káva), ferulová (celozrnné obiloviny), skořicová (špenát, hlávkový salát), gallová (víno) a kyselina ellagová (ořechy, bobuloviny) (Komprda, 2009). Flavonoidy mají nejen potenciální antioxidační účinek, ale i účinky antibakteriální, protizánětlivé či protirakovinné. K ochraně proti oxidaci může být využita cibule a také koření (rozmarýn, šalvěj, tymián, majoránka, dobromysl). Například rozmarýn a šalvěj obsahují kyselinu karnosovou, jež chrání buňky právě před oxidací (Kastnerová, 2012; Xiang et al., 2013; Manohar et al., 2017).

2.4.2 Karotenoidy

Karotenoidy se řadí mezi terpeny, jsou to izoprenové sloučeniny. Karoteny α a β mají dva cyklohexenylové kruhy, karoteny γ a δ mají jeden kruh a lykopen kruh nemá, je to lineární uhlovodík. Z některých karotenů vznikají právě vitaminy A_1 (retinol) a A_2 (dehydroretinol). β-karoten je předstupeň vitaminu A. Přeměna na tento vitamin je závislá na účinnosti a kontrole štěpení ve střevní sliznici. Oxidovaný retinol na retinal je významný v sítnici oka, v mechanismu vidění. Jako antioxidanty se karotenoidy účastní redukce radikálů, jež jsou na uhlíku a alkylperoxylových radikálů v lipidech. Zdrojem vitaminu A jsou játra, mléko, vejce, ryby a zelenina (špenát, kapusta, paprika, brokolice, rajčata, citrusové plody, meruňky, hrášek ad.) (Štípek, 2000; Stránský, Ryšavá, 2014).

2.4.3 Vitamin C

Vitamin C, kyselina askorbová, je vitaminem rozpustným ve vodě. Je nutným kofaktorem enzymů. Účastní se syntézy kolagenu, přeměny dopaminu na noradrenalin, redukce železitých a měďnatých iontů, má regulační funkci při translaci genetické inormace. Vitamin C se také řadí mezi významné antioxidanty. Zabraňuje oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě, regeneruje tokoferol z tokoferoxylového radikálu. Nejvyšší množství tohoto vitaminu je v šípku, petrželi, černém rybízu, paprice, kiwi atd. (Štípek, 2000; Komprda, 2003). Závažný nedostatek vitaminu C způsobuje kurděje, ty jsou však ve vyspělích zemích vzácností. Mírný nedostatek vitaminu je již běžný. Vyšší potřebu tohoto vitaminu mají například starší lidé a kuřáci. Mezi příznaky mírného deficitu

se řadí krvácení z dásní, časté infekce horních cest dýchacích či horší hojení ran (Ottoboni, Ottoboni, 2013).

2.4.4 Vitamin E

Vitamin E je skupina izomerů, z nichž nejúčinnější je α-tokoferol. Tento vitamin chrání životně důležité orgány buňky. Lipidy mají klíčovou úlohu v našem těle, v membránách, lipoproteinech, hormonech, nervových tkáních atd. Při útoku volných radikálů na lipidy, dojde k jejich oxidaci, na kterou jsou velmi citlivé. Pouze oxidace jedné molekuly lipidu, může spustit řetězovou reakci, která zoxiduje všechny molekuly. Vitamin E dokáže přerušit tuto oxidační řetězovou reakci. Vitamin E má lipofilní část, kterou se dostane dovnitř membrány a hydrofilní část, jež zůstane blízko povrchu. Jelikož je rozpustný v tucích, měl by se užívat po jídle obsahujícím tuk. Jeho potřeba se zvyšuje při stresu, pro těhotné a kojící ženy, děti, při menopauze. Ke ztrátě vitaminu dochází právě oxidací (Jordán, Hemzalová, 2001; Papas, 2001; Kastnerová, 2014).

Jako antioxidant působí v membránách lipidů a lipoproteinů. Při peroxidaci lipidů jsou přeměňovány alkylperoxylové radikály na hydroxyperoxidy, které jsou dále zredukovány glutathionperoxidázou. Peroxylové radikály mastných kyselin jsou tak zneškodněny dříve, než by došlo k atakování sousedních lipidů. Při této reakci je tokoferol přeměněn na tokoferolový radikál, ten je zčásti redukován askorbátem zpět na tokoferol (Štípek, 2000). Zdrojem vitaminu E jsou rostlinné oleje, obilné klíčky, semena a ořechy (Stránský, Ryšavá, 2014).

2.4.5 Koenzym Q_{10}

Ubichinon neboli koenzym Q je skupina benzochinonů, jež se liší délkou lipofilního izoprenového řetězce. Mezi nejrozšířenější u savců patří koenzym Q_{10}, jež je tvořen deseti pětiuhlíkovými izoprenovými jednotkami. Koenzym Q_{10} slouží jako přenašeč elektornů v dýchacím řetězci mitochondrií. Také má antioxidační vlastnosti v membránách ve spolupráci s tokoferolem (Štípek, 2000). Koenzym Q_{10} je obsažen v mase, játrech, rybách, vejcích. V potravinách rostlinného původu se vyskytují jiné koenzymy Q, které se v organismu přemění na koenzym Q_{10}. Se zvyšujícícm se věkem se jeho potřeba zvyšuje, také schopnost těla ho syntetizovat je snížena. Jeho zásadní význam k využití kyslíku mají všechny buňky, ale nejvíce potřebný je pro srdeční sval. Symptomem nedostatku koenzymu Q je únava, ale i právě selhání srdečního svalu (Ottoboni, Ottoboni, 2013; Kasper, 2015).

2.4.6 Glutathion

Glutathion (GSH) se řadí mezi nejvýznamnější intracelulární neenzymové antioxidanty. Podílí se také na řadě buněčných procesů. Z chemického hlediska se jedná o tripeptid, ɣ-glutamylcysteinylglycin. Patří mezi jedny z nejvýznamnějších thiolové sloučeniny. Je přítomen prakticky ve všech eukaryotních organismech. Ve vysoké koncentraci se nachází v mnoha buňkách, včetně červených krvinek. Nejvíce se vyskytuje v játrech, slezině, ledvinách, čočkách, erytrocytech a leukocytech. Vyskytuje se v redukované formě jako thiol (GSH) nebo v oxidované formě, jako disulfid (GSSG). Poměr GSH/GSSG je považován za indikátor působení oxidačního stresu, jež se organismus snaží udržet stabilní. V opačném případě by mohlo dojít k narušení antioxidační kapacity buňky. V převaze je tedy redukovaná forma, např. v erytrocytech jí je asi pětsetkrát více než formy oxidované. Její poměr však klesá nejen při oxidačním stresu, ale i ve stáří. Poměr GSH/GSSG v krvi může také značit nádorové onemocnění, Parkinsonovu či Alzheimerovu nemoc, kardiovaskulární choroby, cukrovku aj. Jeho funkcí je nejen odstraňování ROS, ale také udržovat sulfhydrylové proteiny, cystein a koenzym A v redukované formě. Dále regeneruje tokoferol a askorbát. Glutathion S-transferáza se účastní detoxikace organismu (Štípek, 2000; Racek, 2003; Caprioli et al., 2012; Komínková et al., 2014).

GSH je také nezbytným substrátem GPx. Je-li zvýšené množství ROS, dojde ke zvýšení poměru GSSG/GSH v tkáních a GSSG unikají z buněk. GSSG je pomocí glutathionreduktázy redukován na GSH. Tato reakce je závislá na NADPH. Neenzymatickou reakcí s ROS může vznikat glutathiylový radikál, díky kterému může vzniknout až superoxid. Snížená hladina GSH v buňkách může tedy značit oxidační stres (Murray et al., 2012; Štípek, 2000).

2.4.7 Metallothionein

Metallothionein je intracelulární, nízkomolekulární a na aminokyseliny cystein bohatý protein. Jeho základní struktury neobsahují aromatické aminokyseliny. Jeho molekula je složena z 60 – 68 aminokyselinových zbytků včetně 20 cysteinů. Terciární struktura je rozdělena na dvě domény. Cysteiny jsou v redukované formě a koordinovány s ionty kovu. Jedna molekula savčího metallothioneinu je schopna navázat 11 jednovazných nebo 7 dvouvazných kovových iontů. Kovy jsou navázany do tetrahedrálních jednotek. Nejvyšší afinitu má metallothionein k mědi (Cu^{+}), kadmiu

(Cd^{2+}) a zinku (Zn^{2+}). Některé ionty kovů jsou schopny navázaný zinek vytěsnit (měď, kadmium, olovo, rtuť, stříbro a bismut) (Coyle et al., 2002; Tmejová et al., 2014). Vyskytuje se v tělech mikroorganismů, rostlin, hub, bezobratlých živočichů a obratlovců včetně člověka. Známé jsou tři třídy metallothioneinů. Do první třídy paří savci, do druhé hospodářsky významné plodiny (pšenice, kukuřice, rýže atd.) a do třetí třídy se řadí rostlinné a mikrobiální peptidy, tzv. fytochelatiny (Velíšek, Hajšlová, 2009).

Vazbou toxických kovů do stabilních komplexů je zajišťována jejich detoxikace (především kadmia). Vazbou esenciálních kovů (např. zinku) jsou dočasně skladovány v tkáních, než se využijí pro syntézu metaloproteinů nebo dalších látek. Metallothionein tedy vytváří s ionty těžkcýh kovů velmi stabilní komplexy. Je-li zvýšený příjem těchto kovů, pak je zvyšována jejich syntéza v těle. V izolovaných preparátech z živočišných tkání, byl prakticky vždy v těchto komplexech obsažen zinek a kadmium (Velíšek, Hajšlová, 2009). Metalothionen také chrání buňky před oxidačním stresem, působí tedy jako endogenní antioxidant. Jeho další klíčovou rolí je udržování homeostáze kovů v těle, například regulace hladiny zinku a jeho distribuce v organismu (Suemori et al., 2006; Ruttkay-Nedecky et al., 2013).

2.4.8 Antioxidační enzymy

2.4.8.1 Superoxiddismutáza (SOD)

Antioxidační enzym superoxiddismutáza (SOD) je obsažen ve všech buňkách. SOD přeměňuje superoxidový radikál na peroxid vodíku. SOD urychluje tuto dismutaci superoxidu o čtyři řády. SOD má tři druhy, lišící se kofaktorem, kterým je atom kovu, jenž je důležitý pro katalytický účinek enzymu. Atomy kovu jsou mangan, železo nebo společně měď se zinkem (Kastnerová, 2012; Horký et al., 2014; Racek, 2003).

SOD obsahující měď a zinek se skldádá ze dvou identických podjednotek, v každé je po jednom atomu mědi a zinku. Jedná se o velmi stabilní enzym, jež se vyskytuje také v cytosolu a v mezimembránovém prostředí mitochondrií. Gen pro tento enzym je na 21. chromosomu. Mangan obsahující SOD je především v mitochondriální matrix. SOD obsahující železo se nachází v různých bakteriích (Horký et al., 2014; Štípek, 2000).

2.4.8.2 Glutathionperoxidáza (GPx)

V tomto enzymu je obsažen selen, a to ve formě aminokyseliny selenocystein. GPx v organismu katalyzuje redukci peroxidů a současně oxidaci glutathionu. V rámci antioxidačního ochranného systému s katalázou odbourává peroxid vodíku na vodu. Dále se účastní redukce lipidového peroxidu. Mezi další funkce GPx patří kontrola transkripce v imunokompetentních buňkách, zlepšování funkce lymfocytů a také působí protizánětlivě. K normální funkci GPx je potřeba dostatečného množství redukovaného glutathionu, aktivita glutathionreduktázy a přítomnost redukované formy NADPH. Nedostatečné množství bývá např. u diabetiků (Komprda, 2003; Racek, 2003; Navrátil et al., 2008).

V organismu můžeme najít čtyři typy GPx, cytosolovou, fosfolipidovou, gastrointestinální a plazmatickou (Horký et al., 2014). Tento enzym je závislý na selenu, jeho dostatečný příjem je tedy velmi důležitý k maximální antioxidační aktivitě. GPx působením na redukovaný glutathion (GSH) a peroxid vodíku vytváří oxidovaný glutathion (GSSG) a vodu. Substrátem enzymu mohou být však i jiné peroxidy (Murray et al., 2012).

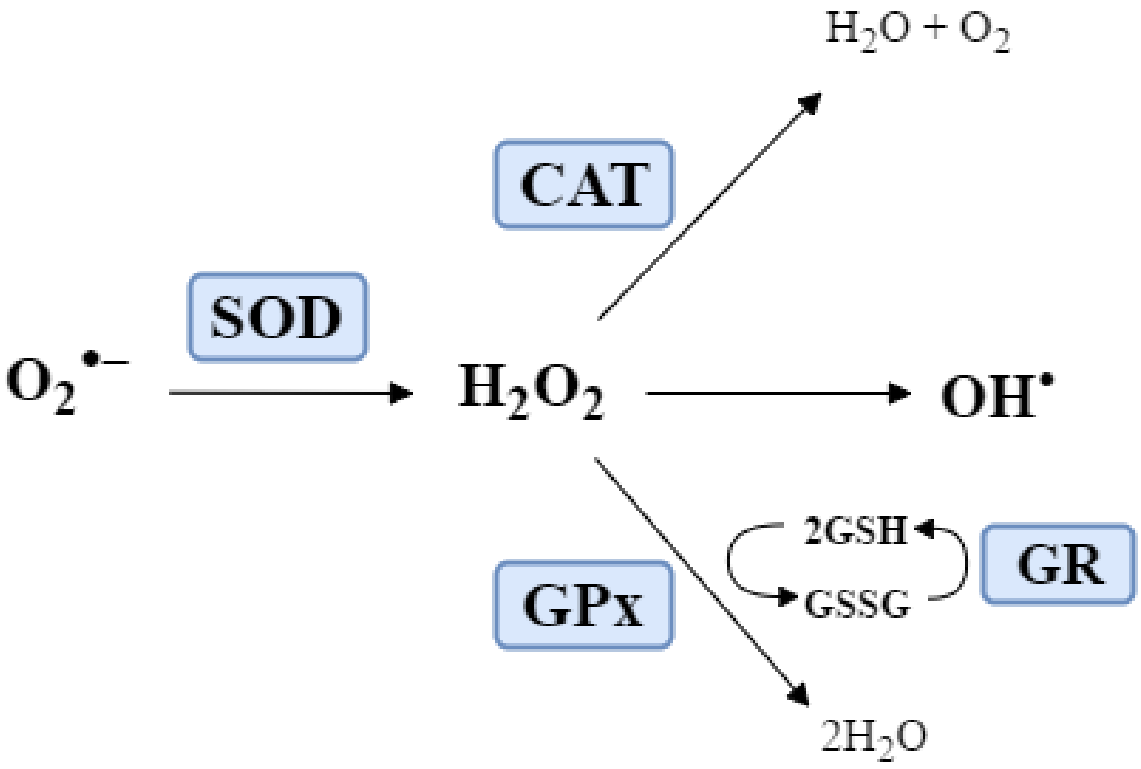
2.4.8.3 Glutathionreduktáza (GR)

GPx katalyzuje oxidaci GSH na GSSG v přítomnosti peroxidu vodíku. Glutathionreduktáza (GR) zabezpečuje zpětnou redukci GSSG na GSH. GR tak udržuje fyziologický poměr GSH/GSSG (10:1) v buňkách (Matoušková et al., 2014). Působením GR a GPx tak dochází k odbourávání peroxidu vodíku na vodu. Riboflavin (vitamin B_2) je součástí enzymu GR, obsahující účinnou skupinu FAD (flavinadenindinukleotid) (Komprda, 2003).

2.4.8.4 Kataláza (CAT)

Kataláza (CAT) je antioxidační enzym, složený ze čtyř tetraedricky uspořádaných podjednotek. V každé má jednu prostetickou protoporfyrinovou skupinu s železitými ionty. Kataláza může katalyzovat peroxidázové reakce (Štípek, 2000). Zajišťuje štěpení peroxidu vodíku za vzniku vody a kyslíku. Oproti peroxidázám působí na peroxid vodíku ve vysokých koncentracích. Aktivita katalázy je u člověka nejvyšší v mitochondriích, peroxisomech hepatocytů a v cytoplazmě erytrocytů. Tyto buňky tedy chrání před vyšší koncentrací peroxidu vodíku. Tím navazuje na činnost SOD (Racek, 2003).

Antioxidační enzymy jsou svojí činností navzájem propojeny. Působení antioxidačních enzymů je znázorněno na obrázku 5. SOD přeměňuje superoxid na peroxid vodíku, který může být dále přeměněn na vysoce reaktivní hydroxylový radikál (pomocí tzv. Fentonovy reakce, působením přechodných kovů). Na jeho odstranění se podílí hlavně kataláza a GPx. Nepříznivý je například stav u kuřáků, kdy je aktivita SOD zvýšená a GPx snížená. Důsledkem je, že nedojde k dostatečnému odstranění peroxidu vodíku v organismu. Fentonově reakci brání i to, že přechodné kovy se ve volné formě v organismu nenacházejí. Jsou návazané na bílkoviny, které se tak řadí také mezi antioxidanty (Racek, 2003).



Obrázek 5: *Působení antioxidačních enzymů v buňkách (Racek, 2003; upraveno). Volný radikál superoxid je redukován enzymem SOD na H_2O_2, který může být redukován pomocí enzymů GPx nebo CAT na vodu nebo vodu a kyslík. GPx oxiduje GSH na GSSG, který je zpět redukován pomocí GR. Není-li H_2O_2 redukován, vzniká Fentonovou reakcí nebezpečný hydroxylový radikál. Nejsou-li nadbytečné reaktivní částice redukovány, dochází k poškozování buněk v organismu. [$O_2^{\bullet-}$ (superoxid), H_2O_2 (peroxid vodíku), H_2O (voda), O_2 (kyslík), $OH^{\bullet}$ (hydroxylový radikál), SOD (superoxiddismutáza), CAT (kataláza), GPx (glutathionperoxidáza), GR (glutathionreduktáza), GSH (glutathion), GSSG (oxidovaná forma GSH)]*

2.4.9 Metody stanovení antioxidační aktivity

Metod ke stanovení antioxidační aktivity je velký počet. Je to proto, že antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji se jedná o přímou reakci s radikály,

jejich zhášení či vychytávání, nebo reakci s přechodnými kovy. Antioxidační působení je tedy založeno na různých principech. Obecně mohou být rozděleny do dvou skupin, metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek (Paulová et al., 2004). Mezi metody stanovující antioxidační kapacitu patří například metody ORAC, TEAC, DPPH, FRAP (Hettiarachchy et al., 2012).

2.4.9.1 Metoda DPPH

Metoda DPPH je považována za jednu ze základních metodik k posouzení antiradikálové aktivity jak čistých, tak i směsných vzorků. Principem metody je stanovení antioxidační aktivity, a to pomocí stabilního radikálu DPPH a jeho následné reakce s antioxidanty, která je doprovázena barevnou změnou.

Metoda je založena na reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem ($DPPH^{\bullet}$), fialové barvy. Během reakce dochází k redukci radikálu a vzniku DPPH − H, žluté barvy. Dojde-li k poklesu absorbance při 517 nm, měří se po uplynutí konkrétního konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu. Test je prováděn spektrofotometricky, na mikrotitračních destičkách, elektronovou spinovou rezonancí či pomocí HPLC. Využití poslední metody je vhodné u barevných vzorků. Radikálová aktivita se u směsných vzorků vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách standardu Troloxu (Paulová et al., 2004; Neugebauerová, Vábková, 2011; Hettiarachchy et al., 2012).

2.4.9.2 Metoda ABTS

Metoda ABTS (metoda TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) patří mezi jednu z nejpoužívanějších metod hodnotící celkovou antioxidační aktivitu (TAA). Obecně hodnotí eliminaci radikálů. Je založena na inhibici vzniku radikálového kationtu $ABTS^{+\bullet}$ (2,2-azino-bis-3-etylbenzothiazolin-6-sulfonát) antioxidanty, které jsou obsaženy v biologickém materiálu (Štípek, 2000; Paulová et al., 2004). Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou, syntetické látky Troloxu (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2- karboxylová). Zhášení radikálu ABTS (tmavě modré barvy) antioxidanty, sloužící jako donory vodíku, je sledováno pomocí spektrofotometrie, na základě změn absorpčního spektra, nejčastěji při 734 nm. Kation radikál $ABTS^{+\bullet}$ je v reakční směsi vytvářen oxidací. Nejvíce se využívá systém ABTS/H_2O/peroxidáza nebo ABTS/methmyoglobin/H_2O_2. Postupuje

se tak, že je antioxidant přidán do reakční směsi s radikálem ABTS, nebo je antioxidant již v reakční směsi při generování radikálu $ABTS^{\bullet}$ (Paulová et al., 2004).

TAA vzorků je hodnoceno pomocí parametru TEAC, označující antioxidační kapacitu vzorku, jež je ekvivalentní definovanému množství Troloxu. TEAC je pro čisté látky definována jako milimolární koncentrace Troloxu, která vykazuje stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol/l. Pro směsi je TEAC koncentrace Troloxu (mmol/l), která je rovná antioxidační aktivitě vzorku. Stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduché, rychlé a má široké uplatnění. Je možné hodnotit antioxidační aktivitu látek různého původu nebo i směsné vzorky (Paulová et al., 2004).

2.4.9.3 Metoda FRAP

Metoda FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) je spektrofotometrická metoda, založena na hodnocení redoxních vlastností látek. Principem je redukce železitých iontů (Fe^{3+}) na železnaté (Fe^{2+}). Železité komplexy jsou téměř bezbarvé a po redukci a reakci s dalším činidlem jsou vytvořeny intenzivně modré komplexy. Díky antioxidantům ve vzorku dojde k redukci roztoku železitého komplexu TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin). Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství železnatého komplexu TPTZ, je míra antioxidační aktivity vzorku. Měření probíhá v nízkém prostředí o pH 3,6 (Paulová et al., 2004; Neugebauerová, Vábková, 2011).

2.4.9.4 Metoda FR

Metoda FR (*Free Radicals*) je založena na schopnosti chlorofylinu, což je sodnoměďnatá sůl chlorofylu, přijímat a odevzdávat elektrony za stabilní změny maximální absorpce. K tomuto procesu je potřeba alkalické prostředí a přítomnost katalyzátoru. Kvantifikace hodnot absorobancí je umožněna kalibrací. Ta je založena na schopnosti iontů železa přecházet z formy dvojmocné na formu trojmocnou právě v alkalickém prostředí. Ke stanovení je využíváno spektrofotometrie při vlnové délce 450 nm. Standardem je Trolox nebo kyselina gallová (Sochor et al., 2010).

3 CÍL PRÁCE

Jedním z cílů práce bylo vypracování literární rešerše na dané téma. V experimentální části jsme zjišťovali vliv nanočástic zinku (Zn-NTA a Zn-EDT) na antioxidační aktivitu (pomocí metod DPPH a FR), aktivitu enzymu SOD, metallothionein a koncentraci zinku v játrech a erytrocytech. Cílem bylo ověřit vliv dietních zinkových nanokomplexů jako alternativního zdroje zinku pro živočišný organismus.

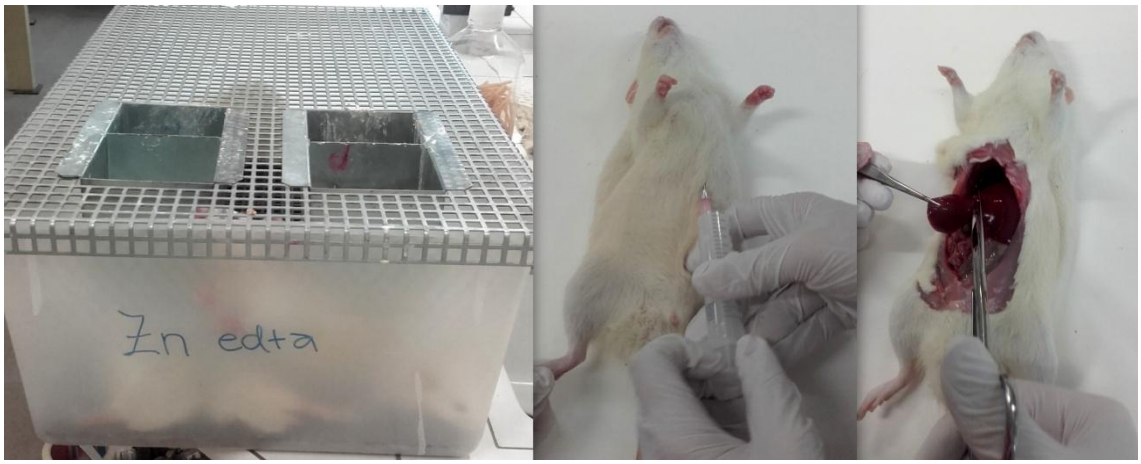
4 MATERIÁL A METODIKA

Pokus byl proveden v experimentálním zařízení Ústavu výživy zvířat a pícninářství MENDELU v Brně (v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb).

V laboratoři byly sledovány mikroklimatické podmínky, které byly limitovány především teplotou, jež byla měřena „DATALOGEREM S 3120“ a byla udržována v rozmezí 23 °C ± 1 °C. Dále byla stejným přístrojem monitorována stálá vlhkost vzduchu a udržována klimatizační jednotkou na hladině 60 %. Fotoperioda byla řízena uměle dle schématu 12 h den a 12 h noc o max. intenzitě 200 lx.

Jako experimentální model pro tento pokus byli použiti samci laboratorního potkana outbredního kmene *Wistar albino.* Průměrná hmotnost potkanů na začátku experimentu byla 235 ± 3 gramů. Pokusné sledování trvalo 15 dní. Potkani byli ustájeni v plastových klecích s rošty. Pokusná zvířata měla po celou dobu trvání experimentu přístup k vodě a krmivu *ad libitum*. Potkani byli rozděleni do 3 skupin. V každé skupině bylo ustájeno 6 samců. První skupina (kontrola) potkanů (n = 6) sloužila jako kontrolní a nebyla jí dávka zinku navýšena. Druhé skupině (Zn-EDT) zvířat (n = 6) byly dávkovány zinkové částice (v množství 200 mg/kg diety). Třetí skupině (Zn-NTA) potkanů (n = 6) byl dávkován zinek ve formě zinkových částic (v množství 200 mg/kg diety). Zvířatům byly zinkové částice aplikovány do diety. Všem skupinám byla zkrmována monodieta (šrotovaná pšenice) s obsahem zinku 32,2 mg/kg/DM.

Potkani byli po 15 dnech trvání experimentu usmrceni. Od zvířat byly získány vzorky erytrocytů a jater, které byly ihned po odběru podrobeny patřičným analýzám.



Obrázek 6: *Ustájení experimentálních potkanů v plastových klecích s rošty a jejich odběr krve a jater.*

4.1 Příprava zinkových částic

4.1.1 Zn-EDT

K roztoku chloridu zinečnatého byla přidána H_4EDTA a za míchání na magnetické míchačce přidáván roztok NaOH ($ZnCl_2 + H_4EDTA + 4NaOH$). pH roztoku bylo upraveno na cca 7 a objem byl doplněn do 100 ml (0,5 g Zn/100 ml).

4.1.2 Zn-NTA

K roztoku chloridu zinečnatého byl za míchání na magnetické míchačce přidán roztok sodné soli nitrilotrioctové kyseliny ($ZnCl_2 + Na_3NTA$). pH roztoku bylo upraveno na 7,16 a objem byl doplněn do 100 ml (0,5 g Zn/100 ml).

4.2 Příprava vzorků pro stanovení metallothioneinu v erytrocytech a játrech

Pro stanovení metallothioneinu v erytrocytech bylo naváženo 100 mg erytrocytů, 1 ml plazmy, nebo 1 g čerstvých jater a hluboce zamraženo tekutým dusíkem po dobu 2 minut. Následně byl ke vzorku přidán 1 ml 0,2 M fosfátového pufru (pH 7,0). Poté byl vzorek homogenizován pomocí ultrazvukové jehly po dobu 2 minut. V dalším kroku byl vzorek homogenizován na Vortex-2 Genie (Scientific Industries, New York, NY, USA) po dobu 15 minut a pak centrifugován při 25 000 rpm/min. (20 minut při teplotě 4 °C). Po centrifugaci se k supernatantu 10 µl přidalo 990 µl destilované vody a při 99 °C byl vzorek denaturován po dobu 20 minut a 300 rpm/minutu (Eppendorf thermomixer comfort, Germany). Po denaturaci byly vzorky centrifugovány (25 000 rpm/min., po dobu 20 minut při 4 °C) a byla změřena celková koncentrace proteinu na přístroji BS 200 (Mindray, China). Koncentrace metallothioneinu byla měřena pomocí pulzní voltametrie. Vzorky byly po celou dobu přípravy uloženy u ledu.

4.3 Stanovení metallothioneinu (MT)

Pro stanovení metallothioneinu byla použita diferenční pulzní voltarometrie na přístroji 747 VA. Přístroj byl připojen k 693 VA procesoru a 695 autosampleru (Metrohm, Švýcarsko), za použití standardní komůrky se třemi elektrodami, chlazeným držákem vzorku a s chlazením komůrek až 4 °C (Julabo F25, Julabo DE). Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s kapkou o objemu 0,4 mm^2 plnila funkci pracovní

elektrody. Ag/AgCl/3M KCl elektrody byl referenční a skleněná uhlíková elektroda byla pomocná. Analyzované vzorky byly před měřením zbaveny kyslíku propláchnutím argonem (99,999%), nasyceného vodou po dobu 120 s. Byl použit pomocný elektrolyt, obsahující 1 mM $Co(NH_3)_6$ Cl_3 a 1 M pufru (NH_3 (aq) + NH_4CI, pH = 9,6). Základní elektrolyt byl vyměněn po každé analýze. Parametry měření byly následující: počáteční potenciál –0,7 V, konečný potenciál –1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, krokový potenciál 2 mV, modulační amplituda –250 mV, objem vstřikovaného vzorku: 10 µl, objem měřící komůrky 2 ml. Výsledek byl uveden v µg/mg.

4.4 Spektrofotometrické stanovení enzymů a antioxidačního potenciálu

Pro stanovení antioxidační aktivity a antioxidačních enzymů byl použit automatický spektrofotometr BS-400 (Mindray, China), který se skládá z kyvetového prostoru (temperovaný na 37 ± 0,1 °C), reagenčního prostoru s karuselem pro reagencie a přípravu vzorků (temperovaný na 4 ± 1 °C) a optického detektoru. Zdrojem světla byla halogeno-wolframová žárovka. Přenos vzorků a reagencí zabezpečovalo robotické rameno s dávkovací jehlou. Obsah kyvet byl promíchán automatickým míchadlem ihned po přidání činidla, nebo vzorku o objemu 2 – 45 µl. Kontaminace byla minimalizována díky proplachování jak dávkovací jehly, tak míchadla MilliQ vodou. Pro detekci bylo možné využít vlnových délek: 340, 380, 412, 450, 505, 546, 570, 605, 660, 700, 740, 800 nm. Zařízení bylo plně kontrolováno softwarem BS-400 (Mindray, China).

4.5 Stanovení superoxiddismutázy (SOD)

Pro stanovení obsahu superoxiddismutázy (SOD, EC 1.15.1.1.) byl použit kit 19160 SOD (Sigma Aldrich, USA). Objem 200 µl činidla R1 (WTS roztoku bylo zředěno 20krát s pufrem) byl pipetován do plastové kyvety a činidlo bylo inkubováno při teplotě 37 °C po dobu 108 s. Poté byl vzorek o objemu 20 µl pipetován a po dobu 378 s probíhala reakce s činidlem R2 (enzymový roztok 167krát zředěný pufrem). Reakce byla zahájena přidáním objemu 20 µl činidla R2. Ta byla inkubována po dobu 72 s. Poté byla měřena absorbance při λ = 450 nm. Kinetická reakce byla měřena108 s. a absorbance byla odečtena každých 9 s. Výsledek byl uveden v U/mg proteinu.

4.6 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody Free Radicals (FR)

U této metody bylo využíváno schopnosti chlorofylinu (sodno-mědnatá sůl chlorofylu) přijímat a odevzdávat elektrony za současné stabilní změny absorpčního maxima. Tento děj byl podmíněn alkalickým prostředím a přídavkem katalyzátoru. Metodika stanovení byla přebrána z publikace (Sochor et al. 2010). Pro stanovení antioxidační aktivity byl použit automatický spektrofotometr BS-400 (Mindray, China). Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 µl reagencie R1 (0,1 M HCl, extrakt chlorofylinu, reakční pufr, katalyzátor) a následně bylo přidáno 6 µl vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 450$ nm. Dle kalibrační křivky byla absorbance přepočítána na ekvivalent kyseliny gallové (GAE).

4.7 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH$^{\bullet}$ testu

Principem DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) testu je schopnost stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH$^{\bullet}$ vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při tomto testu se po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem ($R^{\bullet}$) roztok odbarví dle následující reakce $DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH - H + A^{\bullet}$, $DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow DPPH - R$. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 µl reagencie R1 (0,095 mM 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl − DPPH$^{\bullet}$), následně bylo přidáno 15 µl měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 12 minut při $\lambda = 505$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné a hodnoty absorbance po 12 minutách. Výsledek byl vyjádřen jako spotřeba Troloxu.

4.8 Mikrovlnná digesce pro atomovou absorpční spektrometrii (AAS)

Vzorky erytrocytů o objemu 10 µl byly pipetovány do digesčních lahviček. Následně bylo odváženo 10 mg homogenizovaných jater přímo do digesčních lahviček. Pro mikrovlnný rozklad byla použita směs kyseliny dusičné (65%) a peroxidu vodíku (30%) vždy v poměru 7:3 (350 µl HNO3 a 150 µl H2O2) v celkovém objemu 500 µl digesční směsi. Digesce byla provedena 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). V hlavní části programu byl výkon nastaven na 100 W (po dobu 30 min při 140 °C).

4.9 Stanovení zinku pomocí AAS

Zinek byl stanoven technologií Agilent 280Z atomového absorpčního spektrometru (Agilent, USA) s elektrotermickou atomizací. Zinková ultrasenzitivní výbojka s dutou katodou (Agilent) 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 µl byl nastříknut do grafitové trubičky. Průtok inertního plynu (argon) byl 300 ml/min. Zeemanova korekce pozadí byla použita s intenzitou pole 0,8 Tesla. Zinek byl stanoven v přítomnosti chemického modifikátoru palladia. Výsledek byl vyjádřen v mg/kg.

4.10 Statistika (zpracování výsledků)

Data byla statisticky analyzována pomocí programu STATISTIKA.CZ verze 10.0 (StatSoft CR s.r.o., Česká republika). Výsledky jsou vyjádřené jako průměr ± směrodatná odchylka. Statistická průkaznost byla sledována mezi skupinami pokusných zvířat za použití ANOVA a Scheffého testu – jednofaktorová analýza (faktor skupina zvířat) pro parametry SOD, DPPH, FR, zinek, metallothionein. Rozdíl mezi průměry při $P < 0,05$ byl považován za průkazný.

5 VÝSLEDKY

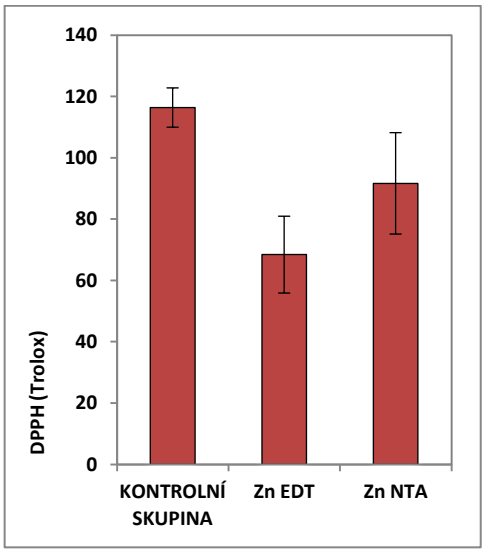
Během experimentu byli pokusní potkani krmeni zinkovými nanočásticemi Zn-EDT nebo Zn-NTA. Po odběru vzorků byla analyzována jejich antioxidační aktivita (metodami FR a DPPH), aktivita superoxiddismutázy (SOD), množství metallothioneinu (MT) a zinku (Zn) vždy v erytrocytech a játrech. Výsledky byly sledovány vždy u skupiny kontrolní (kontrolní skupina) a u dvou skupin pokusných (Zn-EDT a Zn-NTA).

5.1 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH v erytrocytech a játrech

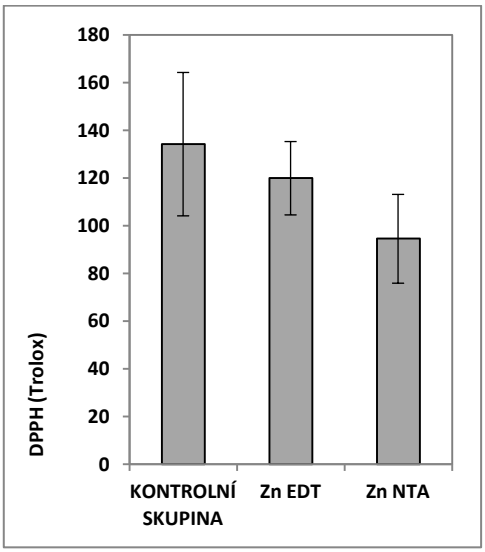
Z grafů 1 a 2 lze pozorovat výsledky stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH a to v erytrocytech (Graf 1) a játrech (Graf 2).

V erytrocytech (Graf 1) byla antioxidační kapacita u skupin Zn-EDT a Zn-NTA statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) oproti skupině kontrolní. U skupiny Zn-EDT byla aktivita nižší než u skupiny Zn-NTA.

V játrech (Graf 2) byla zjištěna nižší antioxidační aktivita u obou pokusných skupin (Zn-EDT, Zn-NTA) oproti kontrolní skupině, avšak nebyla statisticky průkazná. U skupiny Zn-NTA byla antioxidační aktivita nižší než u skupiny Zn-EDT.



Graf 1: *Stanovení DPPH v erytrocytech.*



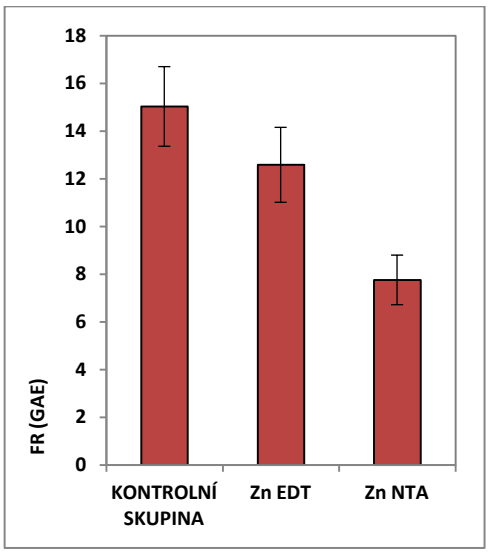
Graf 2*: Stanovení DPPH v játrech.*

5.2 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou Free Radicals (FR) v erytrocytech a játrech

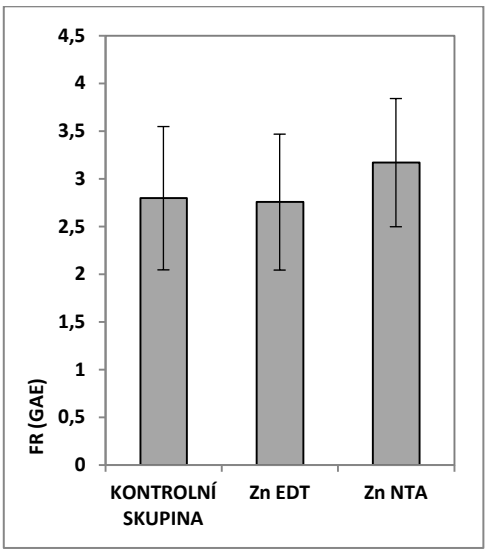
Na grafech 3 a 4 jsou vyobrazeny výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FR (Free Radicals) v erytrocytech a játrech.

V erytrocytech (Graf 3) byla antioxidační aktivita nižší u obou skupin (Zn-EDT, Zn-NTA), než u skupiny kontrolní. Pouze u skupiny, které byly podávány nanočástice zinku Zn-NTA, byla nižší antioxidačí aktivita statisticky průkazná ($P < 0,05$) a byla nižší než u skupiny Zn-EDT.

V játrech (Graf 4) se antioxidační aktivita pokusných skupin (Zn-EDT, Zn-NTA) výrazně nelišila od skupiny kontrolní. Skupina, které byly aplikovány nanočástice Zn-EDT, měla téměř stejnou antioxidační aktivitu jako skupina kontrolní. U skupiny, jež byly podávány nanočástice Zn-NTA, se antioxidační aktivita mírně zvýšila. Výsledky u obou skupin nebyly statisticky průkazné.



***Graf 3**: Stanovení FR v erytrocytech.*



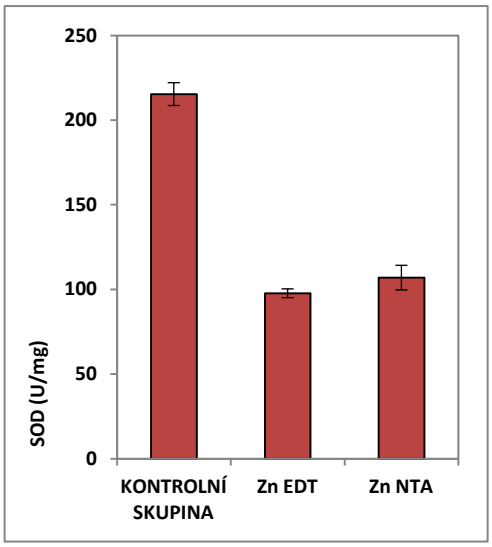
***Graf 4:** Stanovení FR v játrech.*

5.3 Výsledky stanovení aktivity superoxiddismutázy (SOD) v erytrocytech a játrech

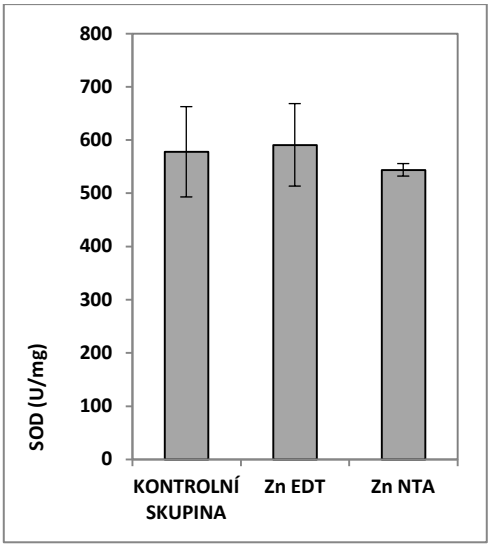
Z grafů 5 a 6 můžeme pozorovat výsledky stanovení aktivity antioxidačního enzymu superoxiddismutázy (SOD) a to v erytrocytech a játrech.

Z grafu 5 lze pozorovat statisticky průkazné ($P < 0,05$) snížení aktivity SOD v erytrocytech u obou pokusných skupin (Zn-EDT, Zn-NTA) oproti skupině kontrolní. Oproti kontrolní skupině byla aktivita SOD snížena cca o polovinu.

V grafu 6, ukazující aktivitu SOD v játrech, lze pozorovat minimální změny oproti skupině kontrolní. U skupiny, které byly aplikovány nanočástice zinku Zn-EDT, se aktivita SOD mírně zvýšila. U skupiny, jež byly aplikovány nanočástice zinku Zn-NTA, se aktivita SOD mírně snížila. Výsledky nebyly statisticky průkazné v porovnání s kontrolou.



Graf 5: *Stanovení SOD v erytrocytech.*



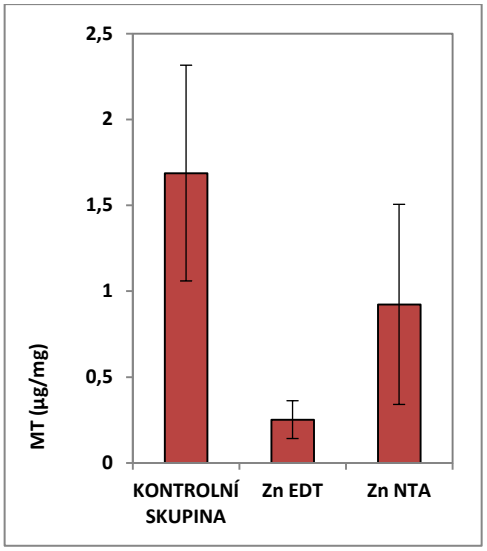
Graf 6: *Stanovení SOD v játrech.*

5.4 Výsledky stanovení metallothioneinu (MT) v erytrocytech a játrech

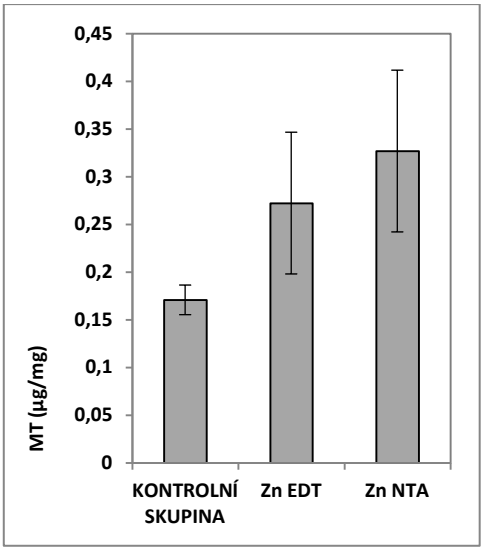
Z grafů 7 a 8 lze pozorovat výsledky stanovení metallothioneinu (MT) v erytrocytech a játrech.

V erytrocytech (Graf 7) se množství MT výrazně snížilo u obou pokusných skupin (Zn-EDT, Zn-NTA) ve srovnání s kontrolní skupinou. Oproti kontrole byla koncentrace MT statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) pouze u skupiny Zn-EDT, toto snžení bylo velmi výrazné. U skupiny Zn-EDT bylo snížení MT výraznější než u skupiny Zn-NTA.

V játrech (Graf 8) se množství MT u obou sledovaných skupin (Zn-EDT, Zn-NTA) zvýšilo oproti skupině kontrolní. Zvýšení koncentrace MT bylo u obou skupin statisticky průkazné ($P < 0,05$). U skupiny Zn-NTA byla koncentrace MT vyšší než u skupiny Zn-EDT.



Graf 7: *Stanovení MT v erytrocytech.*



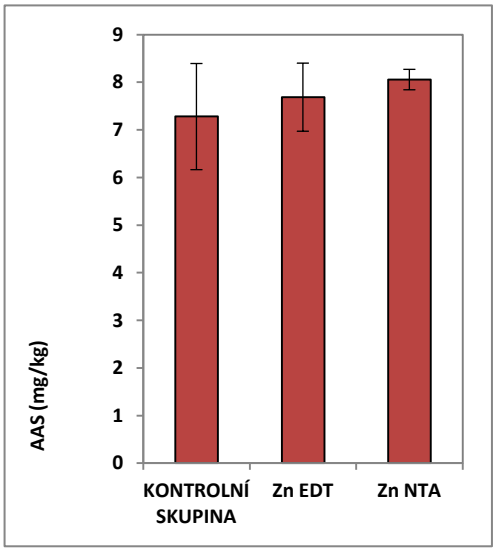
Graf 8: *Stanovení MT v játrech.*

5.5 Výsledky stanovení zinku (Zn) v erytrocytech a játrech

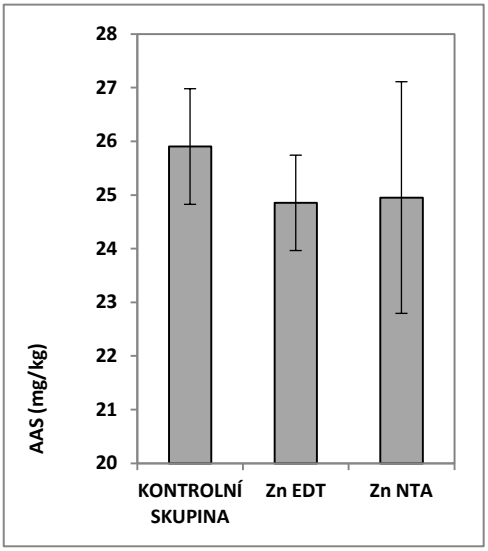
Graf 9 a 10 vyobrazuje stanovení koncentrace zinku (Zn) v erytrocytech a játrech.

V erytrocytech (Graf 9) se oproti kontrole koncentrace zinku mírně zvýšila u obou sledovaných skupin (Zn-EDT, Zn-NTA). U skupiny Zn-NTA byla koncentrace zinku mírně vyšší než u skupiny Zn-EDT. Výsledky nebyly statisticky průkazné.

V játrech (Graf 10) se hladina zinku mírně snížila u obou skupin (Zn-EDT, Zn-NTA) v porovnání s kontrolní skupinou, výsledky nebyly statisticky průkazné.



Graf 9: *Stanovení Zn v erytrocytech.*



Graf 10: *Stanovení Zn v játrech.*

6 DISKUZE

Zinek je významným antioxidantem, tudíž jeho doplňováním do organismu by se jeho antioxidační aktivita měla zvyšovat. Při zvýšeném příjmu zinku se ukládá právě do jater nejčastěji ve formě MT. Při doplňování je však zásadní jeho forma, množství a doba suplementace. Z anorganických forem je zinek využíván jako oxid zinečnatý (ZnO) a síran zinečnatý ($ZnSO_4$). Z chelátových forem zinek glycin chelát (Zn-Gly) či zinek proteinát (Zn-Pro). V posledních letech se začíná více využívat i zinkových nanočástic, nejčastěji ZnO (NZnO). Nanočástice jsou nejčastěji vyráběny chemickou cestou (redukcí). Díky své velikosti nanočástice snadněji pronikají do organismu.

V našem experimentu byli použiti laboratorní potkani outbredního kmene *Wistar albino*. Byli rozděleni do 3 skupin. První skupina sloužila jako kontrolní. Dalším skupinám byly dávkovány zinkové částice Zn-EDT nebo Zn-NTA v množství 200 mg/kg diety. Pokusné období trvalo 15 dní.

Zetzsche et al. (2016) provedli studii, která se zabývala vlivem vysoké dávky zinku (ZnO) na 40 odstavených selatech po dobu 4 týdnů. Ta byla rozdělena do dvou skupin. Jedné skupině bylo podáváno 100 mg Zn/kg (nZn) a druhé 2100 mg Zn/kg (hZn). Po dvou týdnech byla části selat ze skupiny hZn podávána dieta jako u nZn (cZn). Koncentrace zinku v játrech byla průkazně vyšší ($P < 0,05$) u skupiny hZn oproti skupinám nZn a cZn. Koncentrace zinku v játrech byla u skupin nZn a cZn podobná.

Studie Wang et al. (2012) se zabývala účinkem ZnO v koncentracích 100 nebo 3000 mg/kg. Experiment byl proveden na selatech a trval 30 dnů. Po suplementaci 3000 mg/kg ZnO se průkazně zvýšila ($P < 0,05$) koncentrace metallothioneinu (MT) a superoxiddismutázy (SOD) v játrech.

Wang et al. (2010) provedli studii, v níž pozorovali účinek zinku na selatech, ta byla rozdělena do 4 skupin. Do krmné směsi jim byl přidán zinek ve formě zinek glycin chelát (Zn-Gly) v množství 0, 50 nebo 100 mg/kg. Čtvrté skupině byl podáván oxid zinečnatý (ZnO) v množství 3000 mg/kg. Po 35 dnech byla selata usmrcena. U pokusné skupiny Zn-Gly (100 mg/kg) byla nižší hladina ($P < 0,05$) zinku v játrech oproti skupině ZnO. Oproti skupině kontrolní byla hladina zinku v játrech u skupiny Zn-Gly (100 mg/kg) vyšší.

Ivanišinová et al. (2016) ve své studii hodnotili účinky organických zdrojů zinku a $ZnSO_4$ na brojlerech. Ti byli rozděleni do 4 skupin. První skupina byla kontrolní,

dalším třem byl podáván zinek v množství 120 mg/kg a to ve formách $ZnSO_4$, zinek glycin chelát (Zn-Gly) nebo zinek proteinát (Zn-Pro). Experiment trval 5 týdnů. SOD v erytrocytech byla nejvíce zvýšena u skupiny Zn-Pro ($P < 0,05$), zvýšila ($P < 0,05$) se i u skupiny Zn-Gly. V játrech nebyla aktivita SOD výrazně ovlivněna doplňováním zinku. Koncentrace zinku v játrech byla vyšší ($P < 0,05$) u všech pokusných skupin (nejvyšší koncntrace byla u skupiny Zn-Pro) oproti skupině kontrolní.

Ma et al. (2011) provedli experiment na brojlerech. Do krmné dávky doplňovali buď zinek glycin chelát (Zn-Gly) v množství 0, 30, 60, 90 nebo 120 mg/kg, nebo $ZnSO_4$ v množství 120 mg/kg. Výsledky byly měřeny po 21 a 42 dnech. Antioxidační aktivita a aktivita SOD v játrech byly nejvyšší ($P < 0,05$) u skupin 90 a 120 mg/kg Zn-Gly.

Nazarizadeh a Asri.Rezaie (2016) provedli pokus na potkanech, kterým byly podávány nanočástice zinku (NZnO) v množství 1, 3 a 10 mg/kg nebo síran zinečnatý ($ZnSO_4$) v množství 30 mg/kg. Aktivita SOD v erytrocytech byla průkazně vyšší ($P < 0,01$) se zvyšujícím se množstvím NZnO a zvyšujícím se časem (hodnoceno po 7, 28 a 56 dnech) v porovnání s kontrolní skupinou. U skupin, které přijímaly $ZnSO_4$ se aktivita SOD také zvýšila ($P < 0,01$) ve srovnání s kontrolní skupinou, zvýšení však nebylo tak velké jako u NZnO.

Zhao et al. (2014) se ve své studii zabývali vlivem nanočástic zinku (NZnO) na brojlerech. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin. První skupina (kontrolní) dostala ke krmivu 60 mg/kg ZnO. Pokusným skupinám bylo podáváno 20, 60 nebo 100 mg/kg NZnO. Celková antioxidační kapacita v játrech byla významně vyšší u skupiny 20 mg/kg NZnO po celou dobu experimentu. U skupin 60 a 100 mg/kg NZnO byla antioxidační aktivita významně vyšší v játrech po 21 a 28 dnech. Aktivita SOD byla významně vyšší u skupin 60 a 100 mg/kg NZnO v játrech po 21 dnech v porovnání s kontrolní skupinou. Jako optimální koncentrace, jež zvyšovala růst a antioxidační status, se jevila 20 mg/kg NZnO.

Wang et al. (2016) provedli studii zabývající se účinky nanočástic ZnO (NZnO) na myších. Do krmné směsi byly přidány tyto dávky NZnO: 0, 50, 500 nebo 5000 mg/kg. Experiment trval 32 týdnů. Nejvyšší dávka NZnO (5000 mg/kg) výrazně zvýšila ($P < 0,05$) obsah zinku v játrech (39,94 mg/kg) ve srovnání s kontrolní skupinou (31,35 mg/kg). Nebyl zjištěn významný rozdíl mezi kontrolní skupinou, 50 a 500 mg/kg NZnO. V našem experimentu (15 dnů) dávka 200 mg/kg nanočástic zinku také nezvýšila hladinu zinku v játrech oproti kontrolní skupině.

Shrivastava et al. (2014) provedli studii zabývající se nanočásticemi ZnO (NZnO) na myších po dobu 21 dní. Výsledky ukazály, že množství 500 mg/kg NZnO snížilo antioxidační aktivitu i SOD v játrech i erytrocytech. Vyšší množství nanočástic působilo na organismus již toxicky.

Z těchto studií vyplývá, že hladina zinku v játrech se zvyšovala jak u forem anorganických, tak u nanočástic ZnO a ve formě zinek glycin chelát. Vysoké dávky nanočástic zinku (5000 mg/kg) značně jeho koncentraci v játrech zvyšovaly, avšak nižší dávka NZnO (50 a 500 mg/kg), stejně jako v našem experimentu (200 mg/kg), koncentraci zinku nezvýšila. V našem pokusu byla hladina zinku v játrech nižší oproti kontrolní skupině. Bylo to zřejmě způsobeno nižší dávkou zinku. Vysoké dávky anorganických forem zinku zvyšovaly koncentraci MT v játrech. Náš experiment ukazuje, že i nanočástice zinku jeho koncentraci zvyšují ($P < 0,05$).

Nanočástice zinku (nižší dávky) vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu oproti anorganickým formám. Při použití NZnO se hladina SOD v erytrocytech a játrech zvyšovala již při dávce 10 – 120 mg/kg. Avšak dávka 500 mg/kg NZnO již aktivitu SOD snížila a to v erytrocytech i játrech. V našem experimentu (200 mg/kg) byla hladina SOD v játrech vyrovnaná a v erytrocytech se výrazně snížila ($P < 0,05$). Důvodem mohla být krátká doba experimentu. V játrech byla antioxidačí aktivita vyšší při použití NZnO a Zn-Gly kolem 100 mg/kg, avšak použití 500 mg/kg NZnO antioxidační aktivitu v játrech a erytrocytech snížilo. V našem experimentu se antioxidační aktivita v erytrocytech snížila (průkazné snížení ($P < 0,05$) u Zn-NTA). V játrech byly hodnoty antioxidační aktivity vyrovnanější v porovnání s kontrolou. Příčinou mohla být příliš vysoká dávka částic zinku a krátká doba experimentu.

7 ZÁVĚR

Cílem bylo ověřit vliv dietních zinkových nanokomplexů jako alternativního zdroje zinku pro živočišný organismus.

Jako experimentální model pro tento pokus byli použiti samci laboratorního potkana outbredního kmene *Wistar albino.* Potkani byli rozděleni do 3 skupin. První skupina (kontrola) (n = 6) potkanů sloužila jako kontrolní a nebyla jí dávka zinku navýšena. Druhé skupině (Zn-EDT) zvířat (n = 6) byly dávkovány zinkové nanočástice (v množství 200 mg/kg diety). Třetí skupině (Zn-NTA) potkanů (n = 6) byl dávkován zinek ve formě zinkových nanočástic (v množství 200 mg/kg diety). Potkani byli po 15 dnech trvání experimentu usmrceni. Od zvířat byly získány vzorky erytrocytů a jater, které byly ihned po odběru podrobeny patřičným analýzám. Byla analyzována antioxidační aktivita pomocí metod FR a DPPH, aktivita SOD, metallothionein a koncentrace zinku.

Výsledky ukazují, že v erytrocytech došlo ke snížení antioxidační kapacity, u Zn-NTA bylo statisticky průkazné ($P < 0,05$). Koncentrace zinku v erytrocytech se neprůkazně zvýšila. V játrech došlo ke statisticky průkaznému zvýšení ($P < 0,05$) metallothioneinu u obou pokusných skupin.

Výsledkem studie je, že použité nanočástice zinku nejsou vhodným zdrojem pro živočišný organismus. Hladina zinku ani antioxidační aktivita se průkazně nezvýšily. Použité množství nanokomplexů 200 mg/kg již na organismus mohlo působit depresivně. Další příčinou mohla být krátká doba experimentu.

V budoucnu by bylo dobré podobný pokus zopakovat. Vhodné by bylo změřit i hladinu redukovaného a oxidovaného glutathionu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADRIANI M., B. WIRJATMADI. The effect of adding zinc to vitamin A on IGF-1, bone age and linear growth in stunted children. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2014, **28**(4), 431−435 [cit. 2017-02-22]. ISSN 0946-672X. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X14001618

ALLOWAY B. J. *Zinc in Soils and Crop Nutrition.* Second edition. Belgium, France: IZA and IFA, 2008, 137 s. ISBN 9789081333108.

ALLOWAY B. J. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health* [online]. 2009, **31**(5), 537−48 [cit. 2017-02-22]. ISSN 1573−2983. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291414

BALVAN J., M. FOJTŮ, H. POLANSKÁ, M. MASAŘÍK, R. KIZEK. Buněčné linie jako modelové systémy pro optimalizaci aplikace kvantových teček. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **1**(3), 23−25 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-04.pdf

BENDER D. A. *Introduction to nutrition and metabolism*. 5th ed. Boca Raton: CRC Press, 2014, 448 s. ISBN 9781466572249.

BOBROWSKA-GRZESIK E., J. CIBA, A. GROSSMAN, J. KLUCZKA, J. TROJANOWSKA, M. ZOLOTAJKIN. *Chemical elements: compendium*. Český Těšín: 2 Theta, 2013, 223 s. ISBN 9788086380667.

CAPRIOLI R. M., A. MALORNI, G. SINDONA. *Mass Spectrometry in Biomolecular Sciences*. Springer Science & Business Media. London: Kluwer Academic Publishers, 2012, 523 s. ISBN 978-9401065818.

COYLE P., J. PHILCOX, L. CAREY, A. ROFE. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2002, **59**(4), 627−647 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1420-9071. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022471

DASTYCH M. Zinek − esenciální stopový prvek. *Labor Aktuell* [online]. 2004, **1**, 23−25 .[cit. 2017-02-22] ISSN 1214-7672 Dostupné z: http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2004/LA0104/zinek.pdf

DOSTÁLOVÁ J., P. KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2014, 425 s. ISBN 9788074182082.

EBERLE J., S. SCHMIDMAYER, R. G. ERBEN, M. STANGASSINGER, H. P. ROTH. Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 1999, **13**(1−2), 21−26 [cit. 2017-02-22]. ISSN 0946-672X. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10445214

EZZATI M., A. D. LOPEZ, A. RODGERS, CH. J. L. MURRAY. *Comparative quantification of health risks*. Genève: Organisation mondiale de la santé, 2004, 2278 s. ISBN 9241580313.

FALADE A. O., G. OBOH, A. I. OKOH. Potential Health Implications of the Consumption of Thermally-Oxidized Cooking Oils. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences* [online]. 2017, **67**(2), 95−105 [cit. 2017-03-01]. ISSN 2083-6007. Dostupné z: https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/pjfns.2017.67.issue-2/pjfns-2016-0028/pjfns-2016-0028.pdf

FIGUEIRA A., E. A. KIDO, R. S. ALMEIDA. Identifying sugarcane expressed sequences associated with nutrient transporters and peptide metal chelators. *Genetics and Molecular Biology* [online]. 2001, **24**(1-4), 207-220 [cit. 2017-04-11]. ISSN 1678-4685. Dostupné z: http://www.scielo.br/pdf/gmb/v24n1-4/9444.pdf

FOJTÍK A. *Nano-fascinující fenomén současnosti: nanočástice, nanostruktury a nanotechnologie-důmyslné formy hmoty: od objevu fenoménu po biomedicínské aplikace*. Praha: COMTES FHT, 2014, 288 s. ISBN 9788026071358.

GUMULEC J., M. MASAŘÍK, R. HRABEC, A. ROVNÝ, H. BINKOVÁ, P. BABULA, V. ADAM, R. KIZEK. Zinek a jeho vztah k nádorům prostaty. *Praktický lékař*. 2010, **90**(8), 456−460. ISSN 0032-6739.

HETTIARACHCHY N. S., K. SATO, M. R. MARSHALL, A. KANNAN. *Bioactive food proteins and peptides: applications in human health*. Boca Raton: CRC Press, 2012, 333 s. ISBN 9781420093179.

HOCHLEITNER R. *Minerály: nový průvodce přírodou*. Praha: Universum, 2015, 255 s. ISBN 9788024247090.

HORKÝ P., B. RUTTKAY-NEDECKÝ, L. NEJDL, L. RICHTERA, N. CERNEI, M. POHANKA, P. KOPEL, J. SKLÁDANKA, P. HLOUCALOVÁ, P. SLÁMA, P. NEVRKLA, V. MLEJNKOVÁ, I. KLUSOŇOVÁ, R. KIZEK, V. ADAM. Electrochemical Methods for Study of Influence of Selenium Nanoparticles on Antioxidant Status of Rats. *International Journal of Electrochemical Science*. [online]. 2016, **11**(4), 2799−2824 [cit. 2017-03-01]. ISSN 1452-3981. Dostupné z: http://electrochemsci.org/papers/vol11/110402799.pdf

HORKÝ P., L. ZEMAN, E. SAPÁKOVÁ, M. HORÁK. *The influence of trace elements on the quality of ejaculate and anti-oxidant potential of boar semen: monographic series*. Brno: Mendel University in Brno, Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 2014, 66 s. ISBN 9788075091352.

HRABĚTA J., T. ECKSCHLAGER, M. STIBOROVA, Z. HEGER, S. KŘÍŽKOVÁ, V. ADAM. Zinc and zinc-containing biomolecules in childhood brain tumors. *Journal of Molecular Medicine* [online]. 2016, **94**(11), 1199−1215 [cit. 2017-03-01]. ISSN 0946-2716. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00109-016-1454-8

CHATGILIALOGLU CH., A. STUDER. *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials*. Volume 1. Chichester: Wiley, 2012, 528 s. ISBN 9780470971253.

CHATGILIALOGLU CH., A. STUDER. *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials*. Volume 3. Chichester: Wiley, 2012, 1260−1700 s. ISBN 9780470971253.

IVANIŠINOVÁ O., Ľ. GREŠÁKOVÁ, M. RYZNER, V. OCEĽOVÁ, K. ČOBANOVÁ. Effects of feed supplementation with various zinc sources on mineral concentration and selected antioxidant indices in tissues and plasma of broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno* [online]. 2016, **85**(3), 285−291 [cit. 2017-04-22]. ISSN 1801-7576. Dostupné z: https://actavet.vfu.cz/85/3/0285/

JELÍNEK P., K. KOUDELA. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003, 409 s. ISBN 8071576441.

JOPP A. *Vitaminy a stopové prvky pro zdraví: optimalizace látkové výměny: význam pro imunitní a nervový systém: osobní program minerálních látek.* Praha: Eminent, 2014, 223 s. ISBN 978-80-7281-489-3.

JORDÁN V., M. HEMZALOVÁ. *Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. Brno: Jota, 2001, 153 s. ISBN 8072171569.

JUŘÍKOVÁ J. *Problematika výživových zvyklostí: monografie*. Brno: Masarykova univerzita, 2013, 151 s. ISBN 9788021061637.

KALOUSOVÁ M. *Patobiochemie ve schématech*. Praha: Grada, 2006, 264 s. ISBN 8024715228.

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

KASTNEROVÁ M. *Poradce zdravého životního stylu*. České Budějovice: Nová Forma, 2012, 378 s. ISBN 978-80-7453-250-4.

KASTNEROVÁ M. *Výživové poradenství v praxi: vědecká monografie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2014, 273 s. ISBN 9788073945008.

KENŠOVÁ R., D. HYNEK, V. ADAM, R. KIZEK. Působení zinku na živé organismy. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **1**(3), 29−31 [cit. 2016-10-20]. ISSN 2336-3940. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-06.pdf

KESSELSA J. E., I. WESSELSA, H. HAASEB, L. RINKA, P. UCIECHOWSKIA. Influence of DNA-methylation on zinc homeostasis in myeloid cells: Regulation of zinc transporters and zinc binding proteins. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2016, **37**, 125−133 [cit. 2017-02-22]. ISSN 0946-672X. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X16300189

KIDA K., T. TSUJI, S. TANAKA, M. KOGO. Zinc deficiency with reduced mastication impairs spatial memory in young adult mice. *Physiology & Behavior* [online]. 2015, **152**(A), 231−237 [cit. 2016-10-24]. ISSN 0031-9384. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938415301360

KIM S. *Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications*. USA: CRC Press, 2013, 840 s. ISBN 9781466505643.

KOMÍNKOVÁ M., O. ZÍTKA, R. KIZEK. Poměr GSH/GSSG u biologických organismů. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **1**(3), 46−48 [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-11.pdf

KOMPRDA T. *Základy výživy člověka*. Brno: Mendelova univerzita, 2003, 162 s. ISBN 978-80-7157-655-6.

KOMPRDA T. *Výživou ke zdraví*. Velké Bílovice: TeMi CZ, 2009, 112 s. ISBN 9788087156414.

KORBEL P., M. NOVÁK. *Minerály: praktická encyklopedie*. 4. vyd. Čestlice: Rebo, 2013, 296 s. ISBN 9788025507230.

KRATOCHVÍLOVÁ P., M. VEČEREK, A. VAŠÁTKOVÁ, L. ZEMAN. Porovnání vlivu anorganické a organické formy doplňku zinku na růst laboratorních potkanů. *MendelNet´*07 Agro. 1. vyd. MZLU v Brně: MZLU v Brně, 2007, s. 51. ISBN 9788073751197.

NAVRÁTIL L., J. RACEK, R. HAVRÁNKOVÁ, L. BERÁNEK, Z. FREITINGER SKALICKÁ, H. SIFFNEROVÁ, E. KANTOROVÁ. Changes in selected parameters of the antioxidant system in radiation damage to the organism. *Journal of applied biomedicine* [online]. 2008, **6**, 195–201 [cit. 2017-03-01]. ISSN 1214-0287. Dostupné z: http://jab.zsf.jcu.cz//6_4/navratil.pdf

LUTZ C. A., K. R. PRZYTULSKI. *Nutrition & diet therapy*. 5th ed. Philadelphia, PA: F.A. Davis Company, 2011. 588 s. ISBN 9780803622029.

MA W., H. NIU, J. FENG a Y. WANG. Effects of Zinc Glycine Chelate on Oxidative Stress, Contents of Trace Elements, and Intestinal Morphology in Broilers. *Biological Trace Element Research* [online]. 2011, **142(**3), 546–556 [cit. 2017-04-22]. ISSN 1559-0720. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12011-010-8824-9

MACH I. *Doplňky stravy: jaké si vybrat při sportu i v každodenním životě*. Praha: Grada, 2012. Fitness, síla, kondice. 2012, 175 s. ISBN 978-80-247-4353-0.

MACIEJCZYK M., B. MIKOLUC, B. PIETRUCHA, E. HEROPOLITANSKA-PLISZKA, M. PAC, R. MOTKOWSKI a H. CAR. Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in Ataxia-telangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome. *Redox Biology* [online]. 2017, **11**, 375–383 [cit. 2017-04-22]. ISSN 2213-2317. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231716303974?np=y&npKey=1d760cb72418682994a136c9f6307aa6008786669fb2f297524fa5d4fe9a9f13

MANDELKER L. *Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů*. Praha: Pierot, 2009. Veterinary clinics of North America, 2009. 220 s. ISBN 9788073531355.

MANOHAR C. M., J. XUE, A. MURAYYAN, S. NEETHIRAJAN, J. SHI. Antioxidant activity of polyphenols from Ontario grown onion varieties using pressurized low polarity water technology. *Journal of Functional Foods* [online]. 2017, **31**, 52−62 [cit. 2017-03-22]. ISSN 1756-4646. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617300476

MAREČEK V., R. CERKAL, T. HUDCOVÁ, P. DOSTÁLEK. Antioxidant activity of barley in regard to the qualitative parameters of malt. *Chemické listy.* 2011, sv. **105**, 1018. ISSN 0009-2770.

MATOUŠKOVÁ M., B. RUTTKAY-NEDECKÝ, R. KIZEK. Antioxidační enzymy-biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **1**(3), 53−55 [cit. 2017-02-28]. ISSN 2336-3940. Dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/journal2.pdf

MCGUIRE M., K A. BEERMAN. *Nutr*. Belmont, CA: Wadsworth, 2013, 387 s. ISBN 9781111578923.

MÜLLEROVÁ D. *Hygiena, preventivní lékařství a veřejné zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2014, 254 s. ISBN 978-80-246-2510-2.

MURRAY R. K., D. BENDER, K. M. BOTHAM, P. J. Kennelly, V. RODWELL, P. A. WEIL. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd. Praha: Galén, 2012, 730 s. ISBN 9788072629077.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1170/2009 ze dne 30. listopadu 2009, kterým se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006, pokud jde o seznamy vitaminů a minerálních látek a jejich forem, které lze přidávat do potravin, včetně doplňků stravy [online]. Dostupné z: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:314:0036:0042:CS:PDF

NEJDL L., B. RUTTKAY-NEDECKÝ, J. KUDR, M. KREMPLOVÁ, N. CERNEI, J. PRÁŠEK, M. KONEČNÁ, J. HUBÁLEK, O. ZÍTKA, J. KYNICKÝ, P. KOPEL, R. KIZEK, V. ADAM. Behaviour of Zinc Complexes and Zinc Sulphide Nanoparticles Revealed by Using Screen Printed Electrodes and Spectrometry. *Sensors* [online]. 2013, **13**(11), 14417−14437 [cit. 2017-02-27]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3871106/

NEUGEBAUEROVÁ J., J. VÁBKOVÁ. Antioxidant activity and phenolic compounds content in the mint. *Úroda: Vědecká příloha* [online]. 2011, 395−401 [cit. 2017-02-26]. ISSN 0139-6013. Dostupné z: http://www.cbks.cz/rostliny2011/prispevky/NeugebauerovaVabkova.pdf

NAGHIPOURA D., H. GHARIBI, K. TAGHAVIA, J. JAAFARI. Influence of EDTA and NTA on heavy metal extraction from sandy-loam contaminated soils. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2016, **4**(3), 3512–3518 [cit. 2017-04-12]. ISSN 2213-3437. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343716302846

NAZARIZADEH A., S. ASRI-REZAIE. Comparative Study of Antidiabetic Activity and Oxidative Stress Induced by Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate in Diabetic Rats. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2016, **17**(4), 834–843 [cit. 2017-04-22]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-015-0405-y

NYGAARD S. B., A. LARSEN, A. KNUHTSEN, J. RUNGBY, K. SMIDT. Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro [beta]-cell function in INS-1E cells. *BMC Research Notes* [online]. 2014, **7**(84) [cit. 2016-11-20]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-84

OKÁČOVÁ L., D. VETCHÝ, A. FRANC, M. RABIŠKOVÁ. Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek technologickými postupy usnadňujícími jejich rozpouštění. *Chemické listy*. 2011, **105**(1), 34−40. ISSN 0009-2770.

OTTOBONI M. A., F. OTTOBONI. *The modern nutritional diseases: heart disease, stroke, type-2 diabetes, obesity, cancer and how to prevent them*. 2nd ed. Fernley, NV: Vincente Books, 2013, 289 s. ISBN 9780915241057.

PAPAS A. *Vitamin E: zázračný antioxidant při prevenci a léčbě srdečních chorob, rakoviny a stárnutí*. Praha: PRAGMA, 2001, 380 s. ISBN 8072057731.

PAULOVÁ H., H. BOCHOŘÁKOVÁ, E. TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. 2004, **98**(4), 174−179 [cit. 2017-02-23]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf

PAVLÍK A., P. SLÁMA. *Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat*. Druhé upravené vydání. Brno: Mendelova univerzita, 2015, 135 s. ISBN 9788075093172.

PRASAD A. S. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Molecular Medicine* [online]. 2008, **14**(5−6), 353−7 [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385818

RACEK J. *Oxidační stres a jeho ovlivnění*. Praha: Galén, 2003, 89 s. ISBN 8072622315.

RACEK J. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 8072623249.

RAHAL A., A. KUMAR, V. SINGH, B. YADAV, R. TIWARI, S. CHAKRABORTY, K. DHAMA. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 1 – 19 [cit. 2017-04-12]. ISSN 2314-6141. Dostupné z: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/761264/

REIHSEROVÁ R. Kondici ve stáří ovlivníme jídlem. *Svět potravin*. 2014, **9**(14), 36−37. ISSN 1803-5140.

RUTTKAY-NEDECKY B., L. NEJDL, J. GUMULEC, O. ZITKA, M. MASARIK, T. ECKSCHLAGER, M. STIBOVA, V. ADAM, R. KIZEK. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, **14**(3), 6044−6066 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1661-6596. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634463/

SEARS M. E. Chelation: Harnessing and Enhancing Heavy Metal Detoxification – A Review. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, **2013**, 1-13 [cit. 2017-04-11]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/219840/

SHRIVASTAVA R., S. RAZA, A. YADAV, P. KUSHWAHA a S. J. S. FLORA. Effects of sub-acute exposure to TiO2, ZnO and Al2O3 nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 2014, **37**(3), 336-347 [cit. 2017-04-22]. ISSN 1525-6014. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01480545.2013.866134?scroll=top&needAccess=true

SILBERNAGL S., F. LANG. *Atlas patofyziologie*. 2. české vyd. Praha: Grada, 2012, 406 s. ISBN 9788024735559.

SOCHOR J., M. RYVOLOVA, O. KRYSTOFOVA, P. SALAS, J. HUBALEK, V. ADAM, L. TRNKOVA, L. HAVEL, M. BEKLOVA, J. ZEHNALEK, I. PROVAZNIK, R. KIZEK. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules* [online]. 2010, **15**(12), 8618−8640 [cit. 2017-02-25]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/15/12/8618

STRÁNSKÝ M., L. RYŠAVÁ. *Fyziologie a patofyziologie výživy*. 2., dopl. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2014, 273 s. ISBN 9788073944780.

SUEMORI S., M. SHIMAZAWA, K. KAWASE, M. SATOH, H. NAGASE, T. YAMAMOTO, H. HARA. Metallothionein, an Endogenous Antioxidant, Protects against Retinal Neuron Damage in Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2006, **47**(9), 3975−3982 [cit. 2017-03-20]. ISSN 1552-5783. Dostupné z: http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2164246

SVAČINA Š., D. MÜLLEROVÁ, A. BRETŠNAJDROVÁ. *Dietologie pro lékaře, farmaceuty, zdravotní sestry a nutriční terapeuty*. 2., upr. vyd. Praha: Triton, 2013, 341 s. ISBN 9788073876999.

SWINNEYOVÁ B., T. ANDERSONOVÁ. V*ýživa v těhotenství: praktický a chutný průvodce prenatální výživou*. Praha: Levné knihy, 2011. 402 s. ISBN 9788073098742.

ŠTÍPEK S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 8071697044.

TMEJOVÁ K., D. HYNEKA, K. ČÍHALOVÁ, R. KENŠOVÁ, R. KIZEK, V. ADAM. Monitorování hladiny metallothioneinu u biologických organismů vystavených působení kovových prvků a sloučenin. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **1**(3), 42−45 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-10.pdf

TVRZNÍK P., L. ZEMAN. *Stopové prvky ve výživě zvířat* [online]. Praha, 2005 [cit. 2016-12-30]. Dostupné z: http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/tvrznik,%20Zeman-stopove%20prvky.pdf

UNDERWOOD E. J., N. F. SUTTLE. *The mineral nutrition of livestock*. 3rd ed. New York, NY, USA: CABI Pub., 1999, 614 s. ISBN 0851991289.

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

VÍTEK L. *Bilirubin a interní choroby: význam pro kliniku a praxi*. Praha: Grada, 2009, 123 s. ISBN 9788024723518.

WANG Y., J. W. TANG, W. Q. MA, J. FENG, J. FENG. Dietary Zinc Glycine Chelate on Growth Performance, Tissue Mineral Concentrations, and Serum Enzyme Activity in Weanling Piglets. *Biological Trace Element Research* [online]. 2010, **133**(3), 325-334 [cit. 2017-04-18]. ISSN 1559−0720. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12011-009-8437-3

WANG M. Q., W. J. TAO, S. S. YE, Y. J. DU, C. WANG a S. X. SHEN. Effects of Dietary Pharmacological Zinc on Growth, Liver Metallothionein, Cu, Zn-SOD Concentration and Serum Parameters in Piglets. *Journal of Animal and Veterinary Advances* [online]. 2012, **11**(9), 1390−1394 [cit. 2017-04-22]. ISSN 1993-601X. Dostupné z: https://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2012.1390.1394

WANG Ch., J. LU, L. ZHOU, J. Li, J. XU, W. LI, L. ZHANG, X. ZHONG, T. WANG. Effects of Long-Term Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Development, Zinc Metabolism and Biodistribution of Minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in Mice. *PLoS ONE* [online]. 2016, **11**(10), 1-14 [cit. 2017-04-18]. ISSN 1932−6203. Dostupné z: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0164434#pone.0164434.ref018

WHITE P. J., M. R. BROADLEY. Physiological Limits to Zinc Biofortification of Edible Crops. *Front Plant Science* [online]. 2011, **2**(80) [cit. 2016-11-22]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355814/

WILLCOX J. K., A. I. OKOH, G. L. CATIGNANI. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2004, **44**(4), 275−295 [cit. 2017-03-01]. ISSN 1549-7852. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490468489

WINKLEROVÁ D. Stanovisko k přidávání zinku do doplňků stravy. *Státní zdravotní ústav* [online]. 2014 [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/stanovisko-k-pridavani-zinku-do-doplnku-stravy

XIANG Q., Y. WANG, W. WU, X. MENG, Y. QIAO, L. XU, X. LIU. Carnosic acid protects against ROS/RNS-induced protein damage and upregulates HO-1 expression in RAW264.7 macrophages. *Journal of functional fous* [online]. 2013, **5**(1), 362−369 [cit. 2017-03-22]. ISSN 1756-4646. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464612001739

ZEMAN L., P. DOLEŽAL, P. MAREŠ, D. KLECKER. Nová role zinku v minerální výživě prasat. *Agro magazín*. 2004, **5**(4), 44−47. ISSN 1214-0643.

ZETZSCHE A., N. SCHUNTER, J. ZENTEK, R. PIEPER. Accumulation of copper in the kidney of pigs fed high dietary zinc is due to metallothionein expression with minor effects on genes involved in copper metabolism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2016, **35**, 1−6 [cit. 2017-04-17]. ISSN 0946-672X. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X16300062

ZHAO C., S. TAN, X. XIAO, X. QIU, J. PAN a Z. TANG. Effects of Dietary Zinc Oxide Nanoparticles on Growth Performance and Antioxidative Status in Broilers. *Biological Trace Element Research* [online]. 2014, **160**(3), 361–367 [cit. 2017-04-22]. ISSN 1559-0720. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-014-0052-2

9 SEZNAM PŘÍLOH

Seznam tabulek

Tabulka 1: Obsah zinku v potravinách živočišného a rostlinného původu v mg na 100 g potraviny. 16
Tabulka 2: Množství doporučeného denního příjmu zinku v mg/den. 18
Tabulka 3: Reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). 23

Seznam obrázků

Obrázek 1: Nanočástice zinku pod mikroskopem. 14
Obrázek 2: Mapa nedostatečného příjmu zinku ve světě. 20
Obrázek 3: Vznik oxidačního stresu. 25
Obrázek 4: Působení antioxidantů proti volným radikálům. 27
Obrázek 5: Působení antioxidačních enzymů v buňkách. 33
Obrázek 6: Ustájení experimentálních potkanů v plastových klecích s rošty a jejich odběr krve a jater. 37

Seznam grafů

Graf 1: Stanovení DPPH v erytrocytech. 42
Graf 2: Stanovení DPPH v játrech. 42
Graf 3: Stanovení FR v erytrocytech. 43
Graf 4: Stanovení FR v játrech. 43
Graf 5: Stanovení SOD v erytrocytech. 44
Graf 6: Stanovení SOD v játrech. 44
Graf 7: Stanovení MT v erytrocytech. 45
Graf 8: Stanovení MT v játrech. 45
Graf 9: Stanovení Zn v erytrocytech. 46
Graf 10: Stanovení Zn v játrech. 46

10 SEZNAM ZKRATEK

ABTS 2,2-azino-bis-3-etylbenzothiazolin-6-sulfonát

CRIP *Cysteine Rich Intestinal Protein*

DNA deoxyribonukleová kyselina

DPPH 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

DPPH$^{\bullet}$ radikál DPPH

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová

EFSA Evropský úřad pro bezpečnost potravin

FR *Free Radicals*

FRAP *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GPx glutathionperoxidáza

GR glutathionreduktáza

GSH glutathion

GSSG oxidovaná forma glutathionu

MT metallothionein

NADP+ nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NTA nitrilotrioctová kyselina

NZnO nanočástice oxidu zinečnatého

$O_2^{\bullet-}$ superoxid

OH$^{\bullet}$ hydroxylový radikál

RNS reaktivní dusíkaté částice

ROS reaktivní kyslíkaté částice

SOD superoxiddismutáza

TAA *Total Antioxidant Activity*

TEAC *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TPTZ 2,4,6-tripyridyl-S-triazin

Trolox kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2- karboxylová