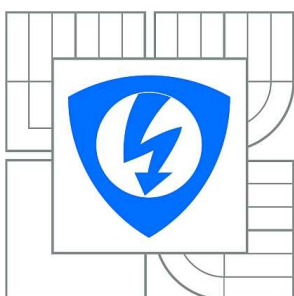


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ELEKTROCHEMICKÉ A MATEMATICKÉ STUDIUM INTERAKCÍ SELENU S BIOLOGICKY AKTIVNÍMI THIOLY

ELECTROCHEMICAL AND MATHEMATICAL STUDY OF INTERACTIONS OF SELENITE WITH
BIOLOGICALLY ACTIVE THIOLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

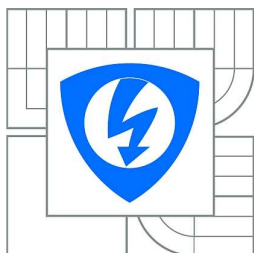
Bc. JAN SLAVÍK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. VOJTĚCH ADAM, Ph.D.

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Student: Bc. Jan Slavík

ID: 106110

Ročník: 2

Akademický rok: 2011/2012

NÁZEV TÉMATU:

Elektrochemické a matematické studium interakcí selenu s biologicky aktivními thiolů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Sumarizujte doposud získané poznatky v oblasti elektrochemické detekce thiolů a jejich interakcí s ionty a s nízkomolekulárními látkami. Zaměřte se na metalothionein a glutathion, popište biologickou funkci těchto thiolů, výskyt, vlastnosti. Použijte databáze Web of Science, Scopus, Scirus, Medline. 2) Navrhněte optimalizaci elektrochemické detekce pro analýzu thiolů a jejich komplexů se selenem za využití elektrochemických technik. 3) Navrhněte možné způsoby interakce s ionty a s nízkomolekulárními látkami. 4) Výsledky vyhodnoťte pomocí statistických a biomedicínských nástrojů.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] PETRLOVA, J., POTESIL, D., MIKELOVA, R., BLASTIK, O., ADAM, V., TRNKOVA, L., JELEN, F., PRUSA, R., KUKACKA, J. KIZEK, R. Attomole voltammetric determination of metallothionein, *Electrochim. Acta*, 2006, pp. 5112-5119.

[2] ADAM, V., PETRLOVA, J., WANG, J., ECKSCHLAGER, T., TRNKOVA, L., KIZEK, R. Zeptomole electrochemical detection of metallothioneins, *PLoS ONE*, 2010, pp. e11441.

Termín zadání: 6.2.2012

Termín odevzdání: 18.5.2012

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujícího autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt:

Proteiny s thiolovými skupinami interagují s ionty kovů v organismu. Udržují jejich homeostázu, účastní se buněčné signalizace, chrání buňku před účinky toxických kovů a detoxikují je. Tato práce je zaměřena na proteiny s thiolovými skupinami glutathionu a metalothioneinu a jejich účinky na selen. Metoda studia je elektrochemická.

Abstract:

Proteins with thiol groups interact with metal ions in the human body. They maintain their homeostasis, participate in cell signaling, protect the cell against the effects of toxic metals and detoxify them. This work is focused on proteins with thiol groups glutathione and metallothionein and their effects on selenium. The method of study is electrochemical.

Klíčová slova:

Selen, Glutathion, Metalothionein, Brdičkova reakce

Keywords:

Selenium, Glutathione, Metallothionein, Brdicka reaction

Bibliografická citace díla:

SLAVÍK, J. *Elektrochemické a matematické studium interakcí selenu s biologicky aktivními thioley*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 53 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Elektrochemické a matematické studium interakcí selenu s biologicko aktivními thioly jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího semestrálního projektu a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil(a) autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl(a) nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujícího autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne ...

.....
podpis autora (autorky)

Poděkování

Za vynikající vedení a konzultace zpracování mé diplomové práce chci poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Vojtěchu Adamovi, Ph.D.

Za vedení v laboratoři a podporu patří můj dík doc. Ing. René Kizkovi, Ph.D.

A dále chci také poděkovat Ing. Daliborovi Húskovi za uvedení do elektrochemických metod.

V Brně dne ...

.....
podpis autora (autorky)

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Selen.....	8
2.1. Objev selenu.....	8
2.2. Vlastnosti selenu.....	8
2.3. Selen ve výživě.....	9
2.4. Metabolismus selenu.....	10
2.5. Selenoproteiny.....	12
2.5.1. Glutathion peroxidázy.....	12
2.5.2. Thioredoxin reduktázy.....	13
2.5.3 Selenoprotein P.....	13
2.5.4. Selenoprotein W.....	13
2.5.5. Jodthyronin 5'-dejodázy.....	13
2.5.6. Selenofosfát synteáza.....	14
3. Thioly.....	15
3.1. Glutathion.....	15
3.1.1. Objev glutathionu.....	15
3.1.2. Struktura glutathionu.....	16
3.1.3. Funkce glutathionu.....	16
3.2. Metalothionein.....	17
3.2.1. Objev metalothioneinu.....	17
3.2.2. Struktura metalothioneinu.....	17
3.2.3. Funkce metalothioneinu.....	18
4. Elektrochemické stanovení thiolů.....	19
4.1. Voltametrie.....	19
4.2. Brdičkova reakce.....	22
5. Cíle práce.....	24
6. Materiály a metody.....	25
6.1. Použité chemikálie.....	25
6.2. Použité přístroje.....	25
6.3. Měřicí metoda.....	26
7. Výsledky a diskuze.....	27
7.1. Optimalizace elektrochemické detekce.....	27
7.2. Měření interakcí thiolů se selenem.....	28
8. Závěr.....	46
Seznam použité literatury.....	47
Seznam zkratk.....	53

1. Úvod

Evolucí se organismy přizpůsobují prostředí, v němž žijí. Moderní doba sebou přinesla razantní změnu životního stylu lidí, na kterou nejsou adaptováni. Je to málo fyzické aktivity, nadměrná konzumace jídla, ale i znečištění životního prostředí. Obrovské množství škodlivých látek zatěžuje lidi každý den požíváním jídla, pitím vody i dýcháním vzduchu. Obranné mechanismy, které si lidé za milióny let evoluce vytvořili, jsou dnes mnohem aktivnější, než kdykoli dříve.

Těžké kovy patří mezi tyto škodlivé látky. Významné mechanismy ochrany organismu před těžkými kovy jsou založeny na interakci těžkého kovu s proteiny s thiolovou skupinou SH. Mezi tyto proteiny patří glutathion (GSH) a metalothionein (MT). Oba tyto proteiny plní i řadu dalších funkcí než je detoxikace těžkých kovů. Podobně jako interagují s těžkými kovy, interagují i s jinými látkami a právě cílem tohoto studia je prozradit jaký mají vztah k selenu. Selen je mikroprvek nutný pro správnou funkci organismu. Selenoproteiny často mívají obdobně jako thioly antioxidační funkce a také se podílí na detoxikaci těžkých kovů. Funkce glutathionu je navíc na selen vázána. Selen se ovšem také při zvýšeném příjmu stává brzy toxickým. Je proto žádoucí zjistit jak glutathion a metalothionein se selenem interagují.

2. Selen

2.1. Objev selenu

Selen byl pravděpodobně poprvé pozorován již okolo roku 1300, kdy alchymista Arnold Villanov ve své knize Rosarium Philosophorum popsal červenou síru, která zůstala v troubě po vypaření nativní síry. Pravděpodobně se jednalo o červenou alotropickou modifikaci selenu. [1-3]

Jednoznačně byl selen objeven významným švédským chemikem Jönsem Jacobenem Berzelienem. Berzelien se spolu se svým přítelem chemikem Johannem Gahnem stal vlastníkem továrny pro výrobu kyseliny sírové. Berzelien a Gahnem spolu studovali látky používané při výrobě kyseliny sírové a jejich pozornost upoutala červená látka, která zůstávala po spalování síry. Nejprve si mysleli, že se jedná o elementární tellur objevený již před 30 lety. V září 1817 o tom Berzelien napsal do Londýna svému příteli Dr. Marcetovi. Později se Berzelien rozhodl látku prostudovat pozorněji a zjistil, že má od telluru odlišné vlastnosti. V únoru 1818 znovu napsal Dr. Marcelovi, tentokrát o objevu nového prvku. Objev selenu se tak datuje na rok 1817 nebo 1818. Název selen je z řeckého slova Selene, což znamená Měsíc. Berzelien ho takto pojmenoval podle telluru, jehož název vychází z latinského slova Tellus, což znamená Země. [4-7]

2.2. Vlastnosti selenu

Selen je vzácný minerál, vyskytující se většinou v rudách síry a telluru. Svými vlastnostmi se podobá síře. Prozatím bylo objeveno šest alotropních forem selenu, mezi něž patří červeně zbarvená amorfní forma, šedá krystalická forma a dále tmavě hnědá a stříbřitě šedá forma. Selen patří mezi polovodiče, tedy látky, které se mohou za určitých okolností chovat jako izolanty nebo vodiče elektrického proudu. Vystavením elektromagnetickému záření generuje elektrický proud. Soli oxidů selenu s elektro pozitivnějšími prvky se označují jako selenany (SeO_4^{-2}) a seleničitany (SeO_3^{-2}). Elementární selen může být redukován na selenid (Se^{-2}) nebo oxidován na již zmíněný seleničitan (Se^{+4}). Elementární selen je ve vodě nerozpustný, ale mnohé z jeho solí jsou rozpustné. Selen se vyskytuje v organických i anorganických sloučeninách. Selen patří mezi reaktivnější prvky. Snadno reaguje s vodíkem, fluorem, chlorem a bromem. Dále reaguje s kyselinou dusičnou, kyselinou sírovou a také řadou kovů kdy vznikají selenidy. U těžkých kovů vykazuje zvýšenou afinitu, zejména k rtuti, dále ke kadmiu, olovu, hliníku, zlatu a stříbru. Při dostatku kyslíku selen hoří modrým plamenem za vzniku SeO_2 s charakteristickým zápachem shnilého křemene. [8]

Vybrané vlastnosti selenu jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1 – Vybrané vlastnosti selenu

Název prvku	Selen
Značka	Se
Skupina	Nekov
Atomové číslo	34
Atomová hmotnost	78,96
Elektronová konfigurace	[Ar] 4s ² 3d ¹⁰ 4p ⁴
Skupenství	Pevné
Hustota při 293 K	4,81 g/cm ³ (krystalická forma)
Teplota tání	221 °C, 490,15 K (krystalická forma)
Teplota varu	685 °C, 958,05 K (krystalická forma)
Oxidační stavy	VI IV II I -II
Pauliho elektronegativita	2,55
Ionizační energie	1. 941 kJ·mol ⁻¹
	2. 2045 kJ·mol ⁻¹
	3. 2973,7 kJ·mol ⁻¹
Atomový poloměr	120 pm
Kovalentní poloměr	120±4 pm
Van der Waalsův poloměr	190 pm
Krystalová struktura	Hexagonální

2.3. Selen ve výživě

Selen byl dlouho považován za výhradně toxický prvek. Teprve v roce 1957 byl poprvé popsán pozitivní vliv selenu na organismus. Tehdy německý biochemik Klaus Schwarz zkoumal důvod nekrózy jater potkanů, které krmil droždím torula. Po náhradě torula droždí pekařským droždím (*Saccharomyces*) nekróza jater u potkanů vymizela. Zjistil, že torula droždí bylo selenodeficitní a tak objevil i první selenodeficitní onemocnění. Na selen tak začalo být nahlíženo i jako na organismu prospěšný prvek. [9, 10]

Selen je esenciálním prvkem, který se oproti jiným esenciálním mikroprvkům stává při vyšších dávkách rychle toxickým. Doporučený denní příjem selenu se udává 50 – 80 µg. [11]

Selen se v organismu účastní řady biologických mechanismů. Významně se uplatňuje zejména v ochranných mechanismech. Má antioxidační účinky, podporuje imunitní systém proliferací aktivovaných T lymfocytů [12, 13], vytváří inertní komplexy se škodlivými prvky jako je kadmium, olovo, rtuť nebo hliník [12]. Některé funkce selenu pracují v kooperaci s vitamínem E, který je také důležitou součástí antioxidačního systému [14, 15]. Lidé s dostatečným příjmem selenu jsou méně ohroženi onemocněním rakoviny [16, 17] a kardiovaskulárními chorobami [12, 18, 19].

Bohatými zdroji selenu v potravě jsou paraořechy a slunečnicová semínka, z běžněji požívaných potravin pak ořechy, játra, sýry, ryby, obiloviny, vejce, vepřové maso, kuřecí

maso, houby. Množství selenu v potravinách, respektive v rostlinných pletivech a živočišných tkáních, se odvíjí od jeho množství v půdě. V zemích severní a střední Evropy, včetně České republiky, je množství selenu v půdě velmi nízké. Nízké množství selenu v potravinách částečně řeší dovoz potravin. Ke zvýšení obsahu selenu v půdě se používaly hnojiva s obsahem selenitu sodného, tento způsob suplementace se ale příliš neujal, kvůli špatné regulovatelnosti množství selenu. Anorganický selen se přidává hospodářským zvířatům do krmiv k prevenci selenodeficitních chorob. [11, 20]

Nedostatkem selenu jsou ohroženi zejména kuřáci, těhotné a kojící ženy, lidé s nevyváženou stravou, jako mohou být například vegetariáni a lidé se zažívacími potížemi. Akutní nedostatek selenu se projevuje svalovou slabostí a bolestí svalů. Selenový deficit může vést k oslabení imunity, ke kardiovaskulárním chorobám, ekzémům, neplodnosti, šedému zákalu a poruchám metabolismu hormonů štítné žlázy [12, 21-23]. Nedostatek selenu lze řešit úpravou jídelníčku, nebo suplementací selenu. K suplementaci se používají jak organické tak i anorganické formy selenu.

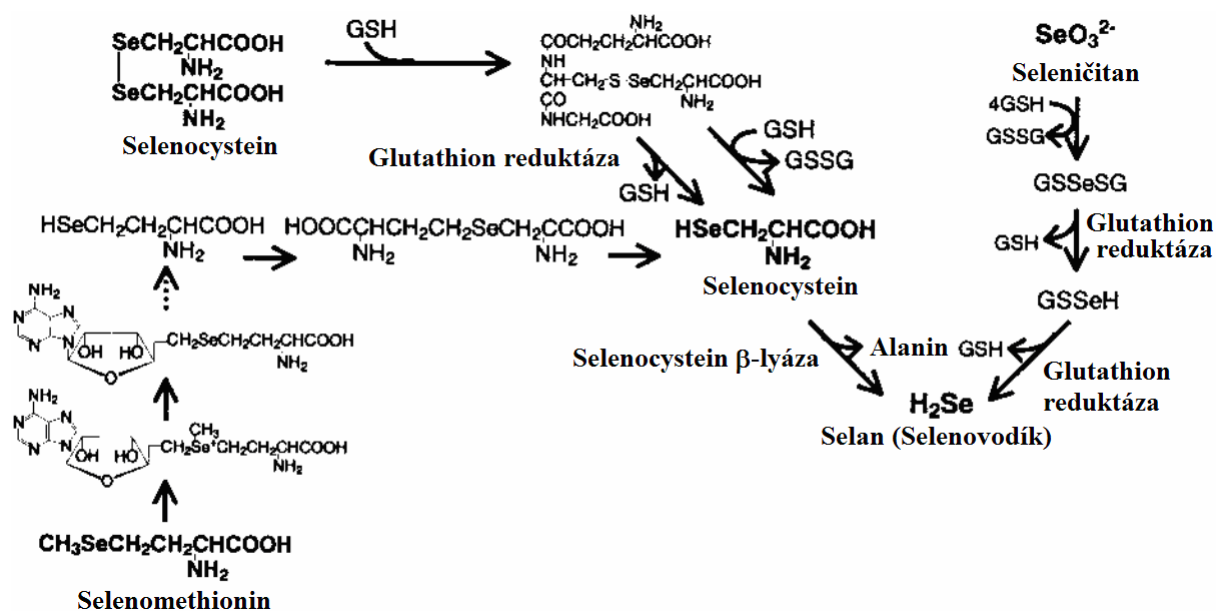
Příjem 5-ti $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ selenu za den je ještě považováno za netoxickou dávku, ale záleží také na formě selenu. Anorganický selen je toxicitější než selen organický. Chronická otrava selenem začíná přibližně od příjmu 1000 μg selenu za den. [24-26] Příznaky se začínají projevovat po několika měsících. Projevy jsou morfologické změny vlasů a nehtů, při ještě vyšších příjmech selenu pak vypadávání a lámavost vlasů a nehtů, bolesti svalů, kožní vyrážky, kazivost a vypadávání zubů, deprese, nervozita, zvracení. Akutní otrava selenem se projevuje renálním a srdečním selháváním, respiračními problémy, apatií a těžkou hypotenzí, která je prvním příznakem vyústujícím ke smrti postižené osoby [27]. Důvodem zvýšeného množství selenu v potravě může být jeho nadměrná suplementace, nebo potraviny z oblastí s vysokým množstvím selenu v půdě, které jsou v Číně nebo Americe a dále i znečištění životního prostředí. [25]

2.4. Metabolismus selenu

Anorganické sloučeniny selenu jsou v zažívacím traktu vstřebávány pasivní difúzí. Vstřebavatelnost je mnohem nižší než u organických sloučenin selenu. Anorganické sloučeniny selenu mohou být metabolizovány na selenoproteiny, ale nejsou schopny být zásobním zdrojem selenu v organismu a jsou z těla vylučovány. Navíc anorganické soli selenu jsou pro-oxidanty. [25, 28]

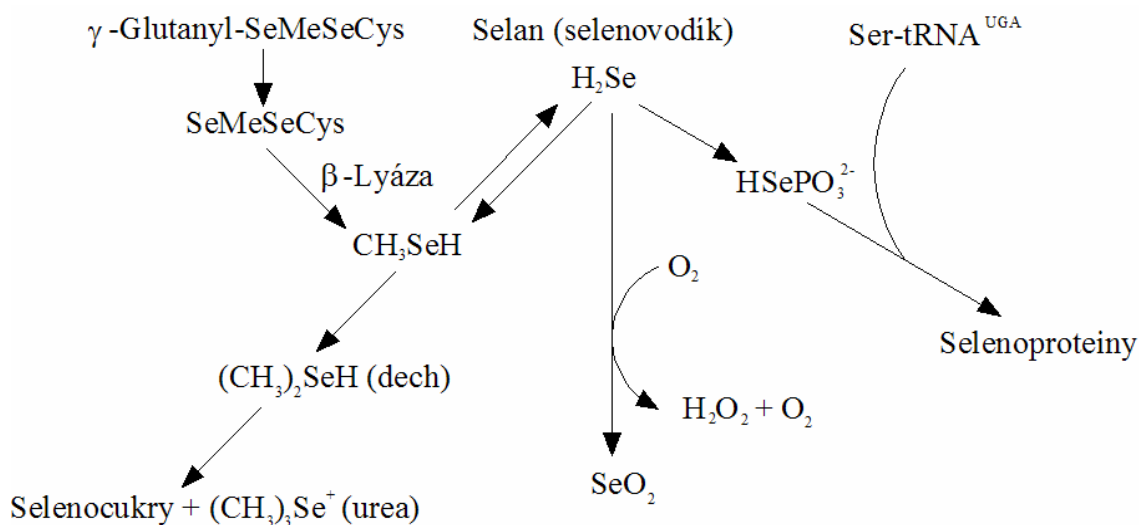
Organické sloučeniny selenu se v zažívacím traktu vstřebávají aktivním transportem. Savčí enzymy při translaci nerozlišují mezi methioninem a selenomethioninem. Do proteinů je tak nespecificky zařazován selenomethionin a vzniká tak zásobní zdroj selenu pro organismus. [25]

Metabolické dráhy selenu začínají rozkladem sloučenin selenu na selen (H_2Se). Rozkládány jsou anorganické i organické sloučeniny selenu a to včetně selenocysteinu přijatého potravou. Rozklad selenocysteinu, selenomethionu a seleničitanů na selen je znázorněn na Obr. 1. [29]



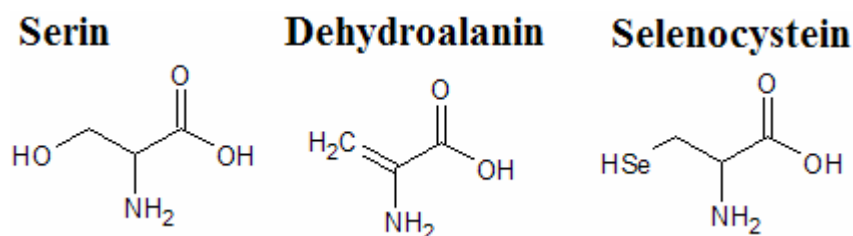
Obr. 1 – Metabolické dráhy přeměny vybraných sloučenin selenu na selen (převzato a upraveno z [29])

Selen se při zvýšeném množství selenu v organismu methyluje a vylučuje z těla dechem nebo močí [30]. Dále se selen může oxidovat na oxid seleničitý [30], u nějž byla například zjištěna protirakovinná ochranná funkce indukci apoptózy [31]. Selen také slouží k tvorbě selenocysteinu pro syntézu selenoproteinů. Metabolické dráhy vycházející ze selenu jsou pak znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2 – Metabolické dráhy selenu

Selenocystein přijatý potravou nelze pro syntézu selenoproteinů přímo použít. Selenocystein zařazený v proteinech vzniká ze serinu navázaného na $tRNA^{Sec}$. Mechanismus je následující. Selenocystein má svou speciální $tRNA^{Sec}$ s antikodonem UGA. Na rozdíl od ostatních tRNA má $tRNA^{Sec}$ dlouhou variabilní smyčku. Seryl- $tRNA$ -synteázou je serin přenesen na $tRNA^{Sec}$ za vzniku seryl- $tRNA^{Sec}$. Selenocysteinsynteázou je pak serin přeměněn na dehydroalanin. Následně je dehydroalanin přeměněn na selenocystein přijetím -SeH skupiny ze selenofosfátu ($HSePO_3^{-2}$). Přičemž selenofosfát vzniká za pomoci selenofosfát-synteázy ze selenidového anionu (HSe^-) a ATP. K inkorporaci 20 standartně kódovaných aminokyselin slouží translační faktor Ef-Tu. U bakterií byl objeven speciální translační faktor selB sloužící k inkorporaci 21. aminokyseliny - selenocysteinu do proteinu při translaci. Bakterie nekódující tento protein nejsou schopny syntetizovat selenoproteiny. U eukaryotických buněk, ale zatím nebyl objeven analog tohoto translačního faktoru [25, 30, 32-35]. Serin, dehydroalanin a selenocystein jsou znázorněny na Obr. 3.



Obr. 3 – Chemická struktura serinu, dehydroalaninu a selenocysteinu

2.5. Selenoproteiny

Selenoproteiny jsou proteiny obsahující aminokyselinu selenocystein. Odhaduje se, že savci syntetizují okolo 100 selenoproteinů z nichž bylo již přes 30 identifikováno [36]. Zde jsou popsány některé ze známých selenoproteinů.

2.5.1. Glutathion peroxidázy

Rodina enzymů glutathionu peroxidáz (GPx), jsou enzymy s peroxidázovou aktivitou pro peroxid vodíku a hydroperoxydy lipidů (lipoperoxydy). Kofaktorem GPx je glutathion (viz. kap. 3.1.3). Struktura GPx také umožňuje přenos selenu a byl i zjištěn silný vztah, mezi množstvím selenu v erytrocytech a GPx aktivitou. Toho lze využít k prvotnímu biochemickému vyšetření množství selenu v těle. Bylo objeveno 8 izoform GPx (GPx1 – GPx8) [37]. Jedná se o tetrametry, kde každý řetězec obsahuje jeden atom selenu s výjimkou GPx4, která je monomery [38]. Přibližně 30% selenu v plasmě je vázáno na GPx. [36]

Dosud nejlépe jsou známy GPx1 až GPx4. GPx1 byla prvním objeveným selenoproteinem a zároveň je to nejčastěji se vyskytující se GPx. Nachází se v cytoplazmě buněk tkání, téměř u všech savců vystavených peroxidům. Aktivita GPx1 je řízena kinázami c-Alb a Arg tyroxin, které se na GPx1 váží. Aktivita těchto kináz je řízena oxidativním stresem [39]. GPx2 se

nachází v gastrointersticiálním traktu, kde je nejdůležitějším selenoproteinovým antioxidantem v tračníku. GPx3 se vyskytuje v plasmě a proximálních tubulech ledvin. GPx4 reaguje s lipoperoxidy a je schopen i oxidace nízkohustotných lipoproteinů. Chrání především mužský reprodukční systém. Aktivita Gx4 je při nedostatku selenu zachovávána přednostně, před GPx1. [36]

2.5.2. Thioredoxin reduktázy

Jedná se o rodinu 3 enzymů. Thioredoxin reduktázy (TRxR) jsou jediné známé enzymy redukující thioredoxiny. Thioredoxiny jsou proteiny, vyskytující se ve všech organismech plnicích biologické funkce, mezi něž patří redoxní signalizace. TRxR spolu s NADPH a thioredoxiny vytváří systém tvořící disulfidické vazby [40]. TRxR má také antioxidantní účinky [41]. TRxR stimuluje proliferaci normálních i rakovinových buněk, u nichž se vyskytuje ve zvýšených koncentracích. [36]

Člověk syntetizuje 3 TRxR izoenzymy. TRxR1 se vyskytuje v cytoplasmě, TRxR2 v mitochondriích a TRxR3 chrání mužský reprodukční systém. [42]

2.5.3 Selenoprotein P

Přibližně 60% selenu v plasmě je vázáno na selenoprotein P (SelP), který ve formě selenocysteinu v sobě obsahuje 10 atomů selenu. Je také bohatý na cystein. SelP spolu s GPx na sebe vážou přibližně 90% plasmatického selenu a oba tyto proteiny mohou sloužit k jeho transportu. SelP se často vyskytuje vázaný na membránu, má proto nejspíše i další funkce. Pravděpodobně mezi ně patří antioxidantní účinky a může sloužit i k detoxikaci iontů rtuti, kadmia a další látek, s nimiž vytváří komplexy. [36, 43]

2.5.4. Selenoprotein W

Selenoprotein W (SelW) se u savců vyskytuje v několika formách. Jejich přibližná délka je 86 aminokyselin s jedním selenocysteinem. U dvou forem SelW je na cysteinový zbytek vázán GSH. SelW je součástí svalového metabolismu. Vyskytuje se v tkáních, především v končetinových svalech, srdci a mozku. Neurální buňky chrání navázáním velice toxické methylrtuti. Má také antioxidantní účinky, jeho syntéza se při oxidativním stresu zvyšuje. [34, 36]

2.5.5. Jodthyronin 5'-dejodázy

Jedná se o tři enzymy vyskytující se v různých částech lidského organismu a se společným výskytem ve štítné žláze, kde společně katalyzují dejodizaci prohormonu tyroxinu T4 na trijodthyronin T3. Ke zjištění funkce štítné žlázy se často monitoruje poměr T4 ku T3 (resp. T3 ku T4) v krvi. S věkem se tento poměr zhoršuje ale suplementací selenu je to možné zlepšit. Z poměru T4 ku T3 lze také zjistit stav selenu v organismu. [36]

2.5.6. Selenofosfát synteáza

U eukaryotických buněk je známá selenofosfát synteáza 1 a 2 (SPS1 a SPS2). Jak již bylo zmíněno selenofosfát synteázy slouží k syntéze selenoproteinů syntézou anorganického selenofosfátu. Syntéza selenofosfátu ale také reguluje biologickou dostupnost organického selenu a tak chrání organismus před velkými dávkami organického selenu. SPS1 neobsahuje selenocystein zatímco SPS2 ano. In vivo bylo zjištěno, že za nepřítomnosti SPS1 a přítomnosti SPS2 dochází k syntéze selenoproteinů, za opačných podmínek ovšem ne. [36, 44]

3. Thioly

Thioly jsou látky obsahující jednovazebnou thiolovou (sulfanylovou) skupinu –SH, vázanou na akyl nebo aromatický kruh. Jsou tedy sirnou obdobou alkoholů nebo fenolů (obsahují skupinu –OH). Mohou tedy být označovány jako thioalkoholy a thiofenoly. Thioly v přírodě vznikají rozkladem sirných aminokyselin cysteinu a methioninu. Charakteristickou vlastností thiolů s malou molekulovou hmotností je jejich nepříjemný zápach. [11, 45]

Atom síry je podobný atomu kyslíku, je tedy na místě srovnání thioalkoholů, které mají funkční skupinou –SH, a alkoholů, které mají funkční skupinou –OH. Jelikož je síra méně elektronegativnější než kyslík, je S–H vazba méně polární než O–H vazba. Atom síry je větší než atom kyslíku, také valenční orbitály síry jsou difúzní a tak dochází k méně efektivnímu překryvu s atomem vodíku. Proto je vodíková vazba S–H méně stabilní než vodíková vazba O–H. [45]

3.1. Glutathion

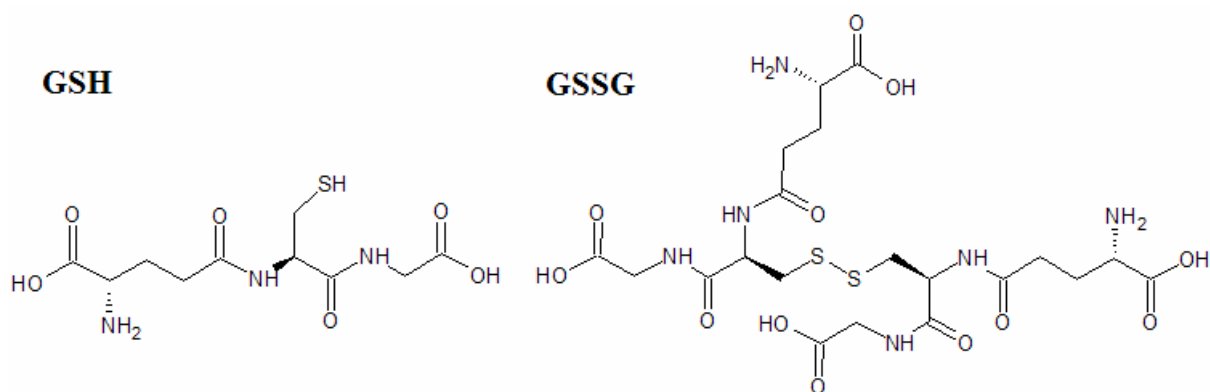
3.1.1. Objev glutathionu

V roce 1888 de Ray-Paihadé drčením kvasinek s elementární sírou zjistil, že obsahují látku zodpovědnou za tvorbu sirovodíku. Následně objevil stejnou látku i v hovězí svalovině, hovězích játrech, ovčím mozku, jehněčím tenkém střevu, rybí svalovině, vaječném bílku, čerstvé ovčí krvi a v čerstvě natrhaných hlavičkách chřestu. Také zjistil, že tato látka je stabilnější v zimě než v létě a je poškozována reakcí s chlórem, jódem a bromem. Tuto látku pojmenoval philothion podle řeckých slov „milující síru“. Věřil v její důležitou biologickou roli, neboť se zdála být přítomna ve všech živých buňkách. Předpokládal, že tato látka obsahuje labilní vodík a na základě myšlenky A. Hefftera došel k závěru, že obsahuje cystein, na němž je tento labilní vodík navázán. [46-50]

A. Hefferd a V. Arnold na mnoha živočišných tkáních prokázaly pozitivní nitroprusidovou reakci, což poukazuje na přítomnost silného redukčního činidla. Za něj byl považován cystein se svou thiolovou skupinou. A. Hefferd také předpokládal, že látky obsahující thiolovou skupinu snižují oxidační stress buněk. F. Hopkinsovy se podařilo tuto látku za pomoci vody izolovat, avšak nesprávně určil, že se jedná o dipeptid cysteinu a kyseliny glutamové a látku přejmenoval z philothionu na glutathion. V roce 1927 byla publikována práce Huntera a Eaglese, kteří stejným postupem jako Hopkins izolovali stejnou látku, ale s nižším procentuálním zastoupením síry. Správně předpověděli, že se jedná o tripeptid, ale Hopkins jejich práci zpochybnil, že látku nezískali čistou a stále trval na dipeptidovém složení glutathionu. Následujících několik let bylo složení glutathionu kontroverzní. Nakonec nezávisle na sobě Hopkins a Kendallem zjistili, že kromě cysteinu a kyseliny glutamové glutathion obsahuje i glycin [51-53]. Struktura glutathionu byla odvozena z chemických studií a syntéz. [54, 55]

3.1.2. Struktura glutathionu

Glutathion je tripeptid skládající se z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Mezi kyselinou glutamovou a cysteinem je zvláštní γ -vazba. U rostlin se vyskytují i homology glutathionu, kdy je místo glycinu navázána jiná aminokyselina. Funkce těchto homologů jsou pravděpodobně stejné. V buňkách se glutathion vyskytuje v redukované nebo v oxidované formě jako disulfid glutathionu. Struktura redukovaného glutathionu (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSG) je na Obr. 4. [56-58]



Obr. 4 – Chemická struktura redukovaného glutathionu (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSG)

3.1.3. Funkce glutathionu

GSH chrání buňky před reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) poskytováním elektronového kompletu (H^+ , e^-). Dochází k tomu tak, že dva GSH jsou oxidovány a následně disulfidovou vazbou spojeny za vzniku GSSG. Tato reakce je katalyzována glutathion peroxidázou (GSH-Px), jejíž kofaktorem je GSH [59, 60]. Reakci lze popsat následující chemickou rovnicí:



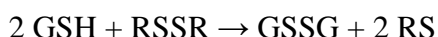
GSSG může být převeden zpět na GSH. To se děje pomocí enzymu glutathion reduktáza za účasti redukčních ekvivalentů z pentózového cyklu. [59]. Tuto reakci lze popsat následující chemickou rovnicí:



Celkové množství glutathionu a poměr GSH/GSSG v krvi je dobrým markrem oxidativního stressu organismu. Vysoký poměr GSH/GSSG může být indikací oxidativních poškození, jako jsou Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza, astma bronchiale, diabetes mellitus, idiopatická plicní fibróza, onemocnění kardiovaskulárního systému, Parkinsonova choroba, syndrom dechové tísně, retinopatie, revmatoidní artritida, Wernerův syndrom. [61-64]

GSH se podílí na detoxikaci těžkých kovů. Za účinku enzymu glutathion S-transferáza GSH konjuguje s elektrofilními látkami a i s některými hydrofóbními látkami. Tato aktivita vede k detoxikaci těžkých kovů, lipidových peroxidů a dalších xenobiotik. [65, 66]

GSH může také redukovat disulfidové vazby vytvořené mezi cytoplasmatickými proteiny. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy glutaredoxiny. [67-69] Tato chemická reakce lze popsat následující chemickou rovnicí:



Z dalších funkcí lze jmenovat, že GSH se účastní metabolismu železa, podílí se na syntéze oxidu dusnatého [70], transportuje aminokyseliny přes buněčnou membránu [71], účastní se metabolických drah, vedoucích k syntéze a opravě DNA a podílí se i na proteosyntéze.

3.2. Metalothionein

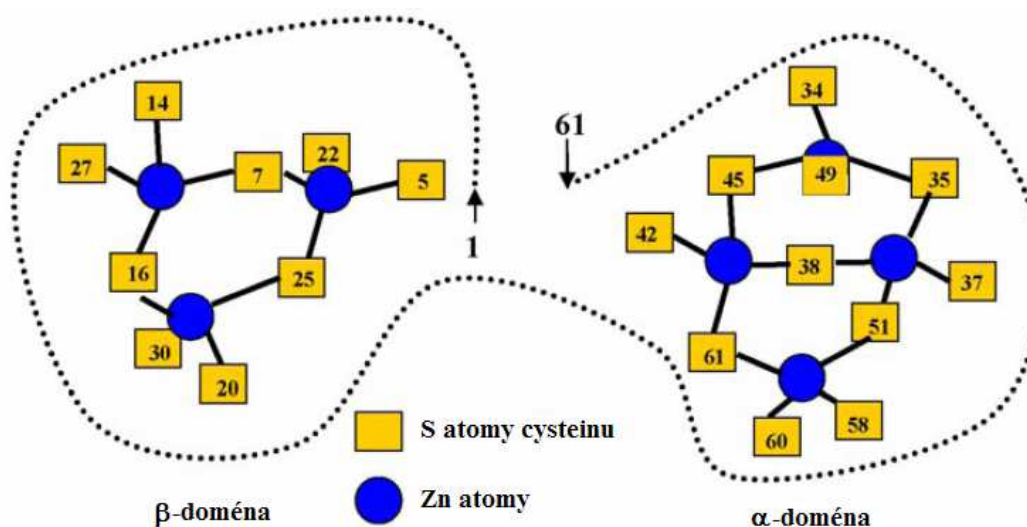
3.2.1. Objev metalothioneinu

Metalothionein (MT) byl objeven v roce 1957, kdy Margoshes a Valee izolovali z ledvinové kůry koně protein vázající kadmium. Byl identifikován jako látka s nízkou molekulární hmotností, bohatá na thiolové skupiny. Vzhledem k vysokému obsahu kovu a své nezvyklé bioanorganické struktuře, byl zařazen mezi metaloproteiny. Během následujících třech desetiletí byl identifikován i u ostatních živočichů a byla podhalena jeho spojitost s dalšími kovy, zejména zinkem a mědí. MT podobné proteiny byly nalezeny i u rostlin a hub. [72-74]

3.2.2. Struktura metalothioneinu

Metalothioneiny jsou rodina jednořetězcových proteinů s molekulovou hmotností 500 až 14000 Da. U savců je molekulová hmotnost MT přibližně 6000 Da. MT má schopnost vázat na sebe kovy a to jak fyziologicky se v buňce vyskytující kovy, mezi něž patří zinek, selen, měď a železo tak na sebe váže i některé toxické kovy, mezi něž patří rtuť, kadmium, arzen, stříbro, platina a olovo. Kovy váže thiolovou skupinou cystein, jenž je ve struktuře MT zastoupen přibližně z 30%. MT se vyskytuje především v játrech, ledvinách, střevech a slinivce břišní. Existuje více typů MT. U člověka se MT dělí do čtyř skupin a to na MT1 s podskupinami A, B, E, F, G, H, L, M, X, dále MT2, MT3 a MT4. Rozdíly ve funkcích jednotlivých forem MT dosud nejsou zcela objasněny. [75, 76]

Struktura metalothioneinu s navázanými 7 atomy zinku je znázorněna na Obr. 5.



Obr. 5 – Struktura metalothioneinu s navázanými 7 atomy zinku (převzato a upraveno z [77])

3.2.3. Funkce metalothioneinu

MT je na sebe schopen vázat až sedm dvojmocných nebo dvanáct jednomocných atomů kovů. Jednotlivá místa, kde dochází k navazování těchto kovů vykazují různou afinitu k různým kovům. MT tak plní důležitou roli při detoxikaci těžkých kovů z organismu. Fyziologicky se vyskytující kovy mohou být z MT vytěsněny kovy toxickými. MT s navázanými těžkými kovy následně putuje do ledvin, kde se vylučuje. Kovy, které nejsou na MT navázány, případně byly z MT vytěsněny, indukují expresi dalších MT. [78, 79]

MT se podílí na ochraně před volnými reaktivními kyslíkovými radikály (ROS), oxidací cysteinu. Dva cysteiny se oxidují na cystin, čímž se také narušuje schopnost MT na sebe vázat kovy. Při zvýšeném oxidačním stresu se tak z MT uvolní ionty kovů, které indukují expresi dalších MT. [78, 80]

Byla prokázána zvýšená syntéza MT v rychle proliferujících buňkách, regenerujících se buňkách a rakovinných buňkách. Předpokládá se vztah mezi vysokou expresí MT a neoplastickým buněčným růstem. Proto lze MT považovat za nádorový marker. MT ovšem buňky před působením některých cytostatik chrání. Před elektrofilními cytostatiky jsou buňky chráněny nukleofilitou MT. Byla vypracována studie, jenž na myší buněčné linii se zvýšenou expresí MT, prokázala ochranné účinky MT před účinky doxorubicinu [81], ale bylo i zjištěno, že chrání buňky i před toxickými účinky látek jako je 1- β -d-Arabinofuranosyl. Z toho se usuzuje na ještě další ochranné mechanismy MT, než je jednoduchá kovalentní vazba. Bylo i prokázáno, že zvýšená exprese MT vede k anti-apotickému účinku. [74, 82, 83]

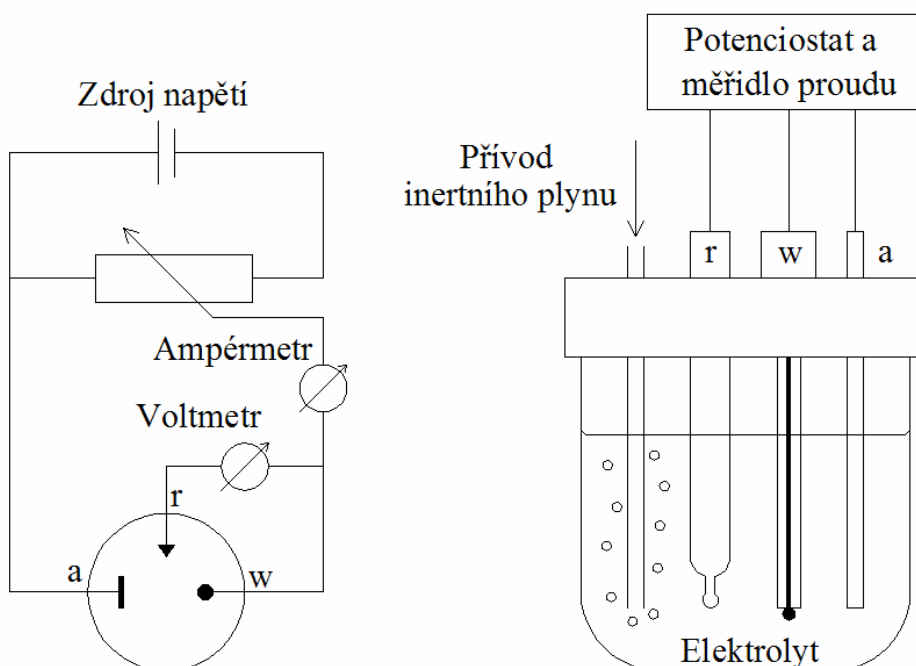
MT také působí jako přenašeč zinku v buněčné signalizaci. Může přenášet zinek mezi jednotlivými proteiny, nebo jej zadržovat. Je tak například schopen regulovat expresi genů inhibovaných proteiny s motivy zinkových prstů. MT může inaktivovat tyto proteiny navázáním zinku, čímž se tyto proteiny z DNA vyváží a umožní se tak transkripce genu. [84]

4. Elektrochemické stanovení thiolů

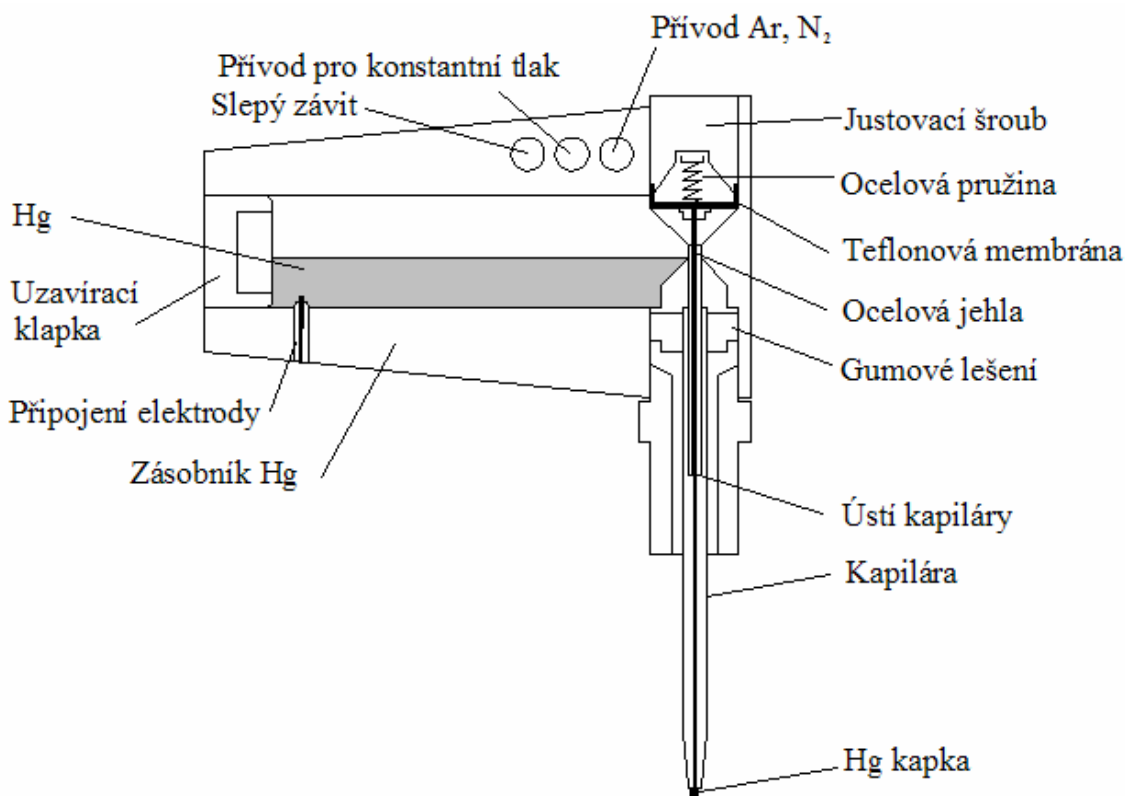
4.1. Voltametrie

Voltametrie je elektroanalytická metoda, při níž se měří velikost proudu protékajícího přes polarizovatelnou pracovní elektrodu v závislosti na potenciálu (resp. napětí), který je na tuto elektrodu vkládán. Toto napětí je vztaženo k nepolarizovatelné referenční elektrodě s konstantním potenciálem. [85-88]

Používá se dvouelektrodové nebo tříelektrodové zapojení. Tříelektrodové zapojení je vhodnější neboť jsou tak potlačeny některé rušivé vlivy. Jedná se zejména o proud, který by bez pomocné elektrody protékal přes referenční elektrodu a způsoboval by tak změnu jejího složení. Při tříelektrodovém zapojení proud protéká přes pracovní a pomocnou elektrodu. Pracovní elektroda může být ze zlata, stříbra, platiny, dále z uhlíku nebo rtuť. Rtuť jako pracovní elektroda může být buď amalgámová nebo v kapalně podobě jako visící rtuťová kapková elektroda (HMDE). Voltametrické metody využívající HMDE se označují jako polarografické. Referenční elektroda bývá nejčastěji argentinchloridová (Ag/AgCl 1/3M KCl). Pomocná elektroda se vyrábí ze zlata, stříbra, nebo platiny. Obvodové schéma a pracovní uspořádání elektrod tříelektrodového zapojení polarografie je zobrazeno na Obr. 6. Uspořádání HMDE je zobrazeno na Obr. 7.



Obr. 6 Vlevo – obvodové schéma tříelektrodového zapojení, Vpravo – pracovní uspořádání elektrod; a – pomocná elektroda, r – referenční elektroda, w – pracovní elektroda



Obr. 7 – Uspořádání HMDE

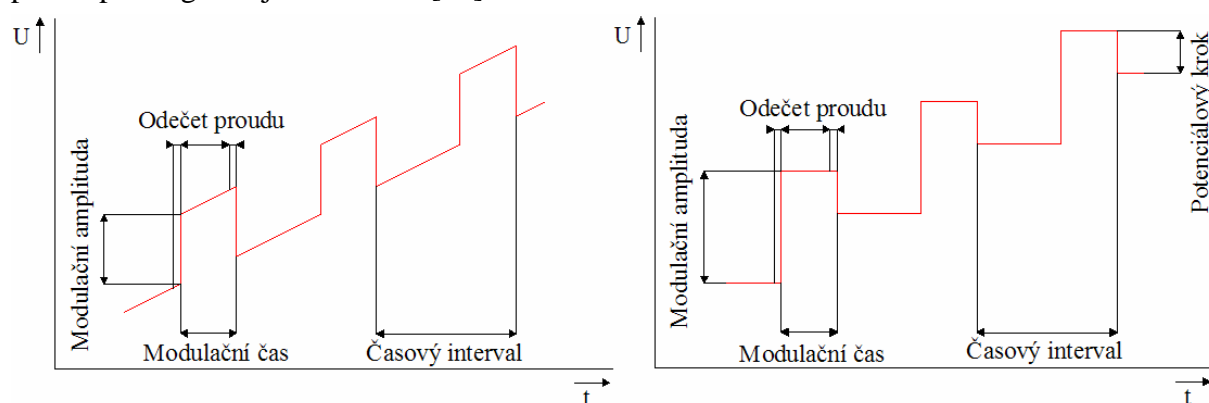
Při polarografii je možno na HMDE vkládat potenciál od $-2,6$ V do $+0,4$ V. Při napětí menším než $-2,6$ V dochází k rozkladu vody (v případě elektrolytu se začnou při vyšších napětích vylučovat kationy), při napětí vyšším než $0,4$ V dochází k rozpouštění rtuti.

Pokud není v elektrolytu obsažena žádná elektroaktivní látka tzv. depolarizátor, systémem neprochází žádný proud. Přidání depolarizátoru se projeví změnou proudu, z jehož velikosti lze určit koncentraci depolarizátoru a z půlvalnového potenciálu lze určit druh depolarizátoru. Potenciál depolarizátoru se může měnit se svou koncentrací. Mohou nastat 4 případy a to, že potenciál se z měnící koncentrací depolarizátoru nemění, potenciál s vzrůstající koncentrací depolarizátoru stoupá, pak jde o limitně difúzní děj, potenciál s vzrůstající koncentrací depolarizátoru klesá, pak jde o adsorpční děj a potenciál s vzrůstající koncentrací depolarizátoru místy klesá a místy stoupá, pak jde o děj kinetický. Celkový zaznamenaný proud je složen z několika různých proudů.

Difúzní proud je přímo úměrný koncentraci depolarizátoru, který se v elektrolytu difúzí dostává k pracovní elektrodě, kde přijímá elektrony z elektrolytické reakce. Kapacitní neboli nabíjecí proud je způsoben vkládáním napětí na rtuťovou kapku. Ta získává náboj, ke kterému jsou přitahovány opačně nabitě ionty. Vzniká tak elektrická dvojvrstva, což je vlastně kondenzátor. K dosažení určitého potenciálu je nutno kondenzátor, resp. rtuťovou kapku nabít kapacitním proudem. Migrační proud se vyskytuje v případě, že depolarizátorem jsou ionty. Elektrické pole mezi elektrodami způsobuje migraci (pohyb) nabitých částic v elektrolytu což ovlivňuje množství depolarizátoru, který se dostává k pracovní elektrodě. Kinetický proud je

u depolarizátorů, jejichž koncentrace je na povrchu elektrody je řízena chemickou reakcí a její rychlostí ale ne difúzí. Adsorbční proud je způsoben adsorpcí oxidované nebo redukované látky na povrchu elektrody při reverzibilními redoxních reakcí některých organických látek. Katalytický proud vodíku vzniká snížením přepětí vodíků v důsledku malé koncentrace katalyzátoru. [89-91]

Podle průběhu vkládaného potenciálu a měření proudu se rozlišuje několik polarografických technik. U klasické polarografie je průběh napětí lineární. Tato metoda je nejméně citlivá, což je způsobeno srovnatelným proudem nabíjecím s proudem elektrolytickým. Citlivější metodou je střídavá polarografie (AC polarografie), u které je na lineárně stoupající napětí superponován sinusový průběh. Využívá se o 90° fázově posunutého nabíjecího proudu oproti proudu elektrolytickému. Fázovým usměrněním se pak získává pouze proud elektrolytický. U „square wave“ polarografie jsou na lineárně stoupající napětí superponovány pravoúhlé impulzy s určitou frekvencí. Měří se difúzní proud s odfiltrovanou stejnosměrnou složkou na konci pravoúhlých impulzů. U metody normální pulzní polarografie je ke konci doby života kapky na konstantní napětí superponován pravoúhlý impulz. Tento impulz se vkládá na posledních 100 ms doby života kapky a proud se měří pouze posledních 20 ms. Po odkápnutí kapky se postup opakuje, ale s vyšším pravoúhlým impulzem. Výsledkem normální pulzní polarografie je polarografická vlna. Nejrozšířenější a nejcitlivější polarografickou metodou je diferenční pulzní polarografie. U této metody jsou na lineárně stoupající napětí nebo skokově stoupající napětí superponovány mále pravoúhlé impulzy. Měří se rozdíl proudů několik milisekund před začátkem a několik milisekund před koncem napěťového pulzu. Obrázek polarizace HMDE u metody diferenční pulzní polarografie je na Obr. 8. [92]



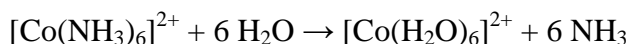
Obr. 8 – Obrázek polarizace HMDE; Vlevo – diferenční pulzní polarografie s lineárně stoupajícím napětím; Vpravo - diferenční pulzní polarografie se skokově stoupajícím napětím

Mimo metody, kdy je analyzována látka smíšená s elektrolytem, kde dochází k jejímu měření, byla vyvinuta adsorptivní přenosová rozpouštěcí technika. Principem je ponoření HMDE přímo do roztoku se vzorkem, kde následně proběhne akumulace analyzované látky na povrch HMDE. HMDE se dále opláchně a ponoří do elektrochemické cely s elektrolytem. Tato metoda má nižší detekční limit a vyšší citlivost. [93]

4.2. Brdičkova reakce

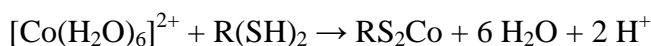
Při použití voltametrie je možno thioly ve vzorcích stanovovat redukcí nebo oxidací SH skupiny, nebo pomocí Brdičkovy reakce. Brdičkův roztok se skládá z amonného pufru ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$) s vysokým pH a chloridu hexaamminokobaltitého komplexu ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$). Brdičkův roztok musí být chlazen na přibližně 4°C , je-li v prostředí s pokojovou teplotou, pak dochází již během několika minut k vypařování amoniaku a brdičkův roztok se tak degraduje. Průběh Brdičkovy reakce je následující.

Při elektrochemickém měření bez přítomnosti látky obsahující $-\text{SH}$ skupinu dojde ke vzniku dvou píků. První pík je způsoben redukcí $\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}}$ za vzniku $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$. Potenciál tohoto píku je $E_p = -0,3 \text{ V}$. Následně proběhne hydrolyza hexaamminkobaltitého komplexu na hexaaquakobalnatnatý komplex dle následující reakce:

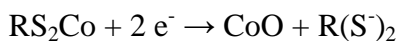


Vzniklý amoniak zvýší pH, čímž umožní další redukcí kobaltu. Druhý pík je způsoben redukcí $\text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^0$. Potenciál tohoto píku je $E_p = -1,2 \text{ V}$.

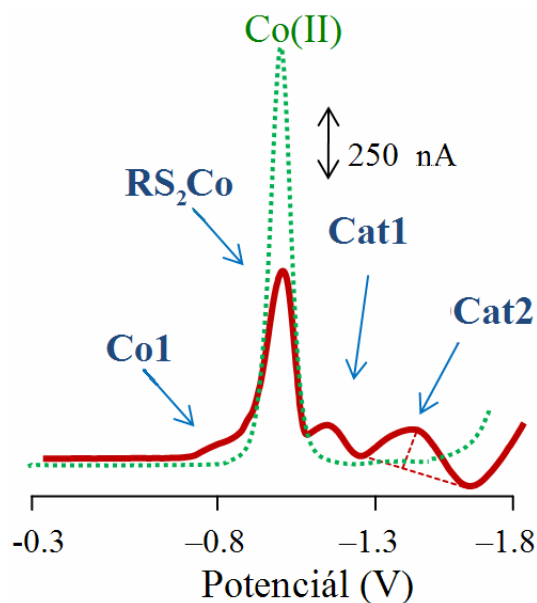
Při elektrochemickém měření za přítomnosti látky obsahující $-\text{SH}$ skupinu dojde ke vzniku čtyř píků z nichž dva jsou katalytické. První pík je způsoben opět redukcí $\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}}$ za vzniku $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$. Potenciál tohoto píku je také $E_p = -0,3 \text{ V}$. Po-té opět proběhne hydrolyza hexaamminkobaltitého komplexu na hexaaquakobalnatnatý komplex a následuje tato reakce:



Druhý pík je způsoben redukcí $\text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^0$ ale nyní Co^{II} vázaného v thiolovém komplexu. Průběh této reakce je:



Skupina $\text{R}(\text{S}^-)_2$ z této reakce okamžitě po svém vzniku přijme protony z NH_4^+ a obnoví se na svou původní formu $\text{R}(\text{SH})_2$. Tato obnovená sloučenina je opět schopna vázat další hexaaquakobalnatnatý komplex $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Třetí pík je označován jako Cat1 a jeho potenciál je $E_p = -1,35 \text{ V}$. Čtvrtý pík je označován jako Cat2 a jeho potenciál je $E_p = -1,48 \text{ V}$. Přesný mechanismus vzniku těchto píků zatím není objasněn, ale Cat2 pík je zřejmě způsoben redukcí H^+ iontů z reakce mezi $\text{R}(\text{SH})_2$ a $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ na povrchu rtuťové elektrody. Ukázka průběhů voltamogramů je zobrazena na Obr. 9.



Obr. 9 – Ukázka voltamogramů Brdičkovy reakce; čárkovaná čára znázorňuje voltamogram základního elektrolytu bez přidaného proteinu, plná čára znázorňuje voltamogram základního elektrolytu s přidavkem proteinu s SH skupinou.

Bylo zjištěno, že výška Cat2 píku je závislá na koncentraci látky obsahující SH skupinu, je tedy možno Brdičkovu reakci využít ke stanovování koncentrace těchto látek [94]. Brdičkova reakce se využívá ke stanovení MT jako markeru znečištění životního prostředí [95-106], dále i stoupá její význam při klinickém stanovování koncentrace thiolů, lze ji využít například ke stanovení MT u pacientů s nádorovým onemocněním [107, 108].

5. Cíle práce

Byly stanoveny následující cíle práce:

1. Optimalizovat elektrochemickou metodu pro analýzu thiolů
2. Elektrochemicky analyzovat interakce L-cysteinu, glutathionu a metalothioneinu se selenem
3. Interpretovat výsledky

6. Materiály a metody

6.1. Použité chemikálie

ACS (Sigma Aldrich, USA)

L-cystein (Sigma Aldrich, USA)

Redukovaný glutathionu (Sigma Aldrich, USA)

Metalothionein II (Sigma Aldrich, USA)

Fragment metalothioneinu – sekvence aminokyselin: KCCCSCCPVG (Clonestar, ČR)

Na₂SeO₃ (Sigma Aldrich, USA)

NH₃ (Sigma Aldrich, USA)

NH₄Cl (Sigma Aldrich, USA)

[Co(NH₄)₆]Cl₃ (Sigma Aldrich, USA)

Všechny vzorky byly rozpuštěny anebo ředěny v ACS vodě, uchovávány byly v lednici při 4 °C.

Příprava 2 l Brdičkova roztoku (amonného pufru):

53,49 g NH₄Cl se rozpustí v 1 l ACS. K roztoku se přidá 0,9898 g [Co(NH₄)₆]Cl₃ a přilije se 1 l 1M NH₃ uchovávaného při 4 °C. Vzniklý Brdičkův roztok se řádně promíchá a uchovává se při 4 °C.

6.2. Použité přístroje

Automatická pipeta 0,1 – 2,5 µl (Eppendorf, Německo)

Automatická pipeta 0,5 – 10 µl (Eppendorf, Německo)

Automatická pipeta 2 – 20 µl (Eppendorf, Německo)

Automatická pipeta 10 – 100 µl (Eppendorf, Německo)

Automatická pipeta 20 – 200 µl (Eppendorf, Německo)

Automatická pipeta 100 – 1000 µl (Eppendorf, Německo)

Automatická pipeta 1000 – 5000 µl (Eppendorf, Německo)

Chladnička - Fagor Innovation

Váha - Analytical balances Cubis® (Sartorius, Německo)

Třepačka - Biometra WT17

Autolab Metrohm 663 VA Stand (Metrohm, Švýcarsko)

GPES 4.9 (Eco Chemie, Nizozemsko) – PC program

6.3. Měřící metoda

Elektrochemické stanovení thiolů a jejich interakcí se selenem je pomocí diferenční pulzní voltametrie s Brdičkovým roztokem jako základním elektrolytem na elektrochemickém analyzátoru Autolab. Jedná se o tříelektrodové zapojení s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) jako pracovní elektrodou, referenční elektroda je Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda je platinová.

7. Výsledky a diskuze

V teoretické části již bylo řečeno, že selen je součástí selenoproteinů, které velmi často hrají v organismu ochrannou roli. Mají antioxidační účinky a detoxikují z těla škodlivé prvky jako je rtuť, kadmium, olovo, hliník, atd. U některých selenoproteinů dochází při zvýšeném oxidačním stresu k zvýšení jejich syntézy. Samotný selen se ale, v porovnání s ostatními organismu prospěšnými prvky, stává při zvýšeném množství rychle toxickým a je potřeba ho z těla vyloučit. GSH a MT jsou thioly, které díky svým thiolovým skupinám mají také antioxidační funkce a jsou také schopny z těla detoxikovat škodlivé prvky. Mohou ale rovněž interagovat i s dalšími prvky, mezi něž patří pravděpodobně i selen. Může být proto zajímavé sledovat jak se budou chovat tyto thioly k anorganicky vázanému selenu. Vysoké koncentrace selenu mohou vypovídat o předávkování tímto prvkem a jeho akutní nutností ho z těla co nejrychleji vyloučit. Naproti tomu vysoké koncentrace GSH a MT mohou být důsledkem vystavení organismu škodlivým látkám, což může být spojeno se zvýšenou potřebou selenu jakožto ochranného prvku.

Pro elektrochemické měření interakcí mezi thioly a anorganicky vázaným selenem, je nejprve nutno optimalizovat elektrochemickou detekci. Následně změřit kalibrační grafy pro jednotlivé analyty a změřit interakce thiolů se selenem za různých koncentrací. Mimo selenu, GSH a MT je dále měřen cystein, který je z hlediska thiolových interakcí funkční jednotkou GSH a MT, a dále je měřen fragment MT.

7.1. Optimalizace elektrochemické detekce

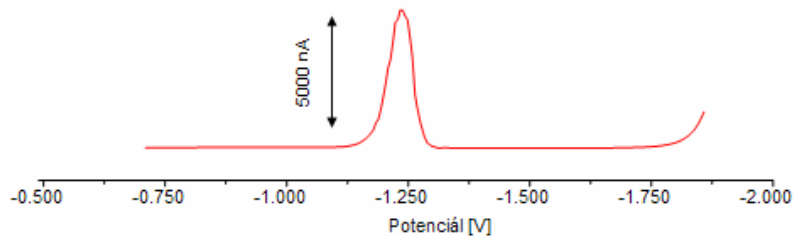
Jelikož dochází k vypařování NH_3 z Brdičkova roztoku, je potřeba Brdičkův roztok chladit a pravidelně měnit. Brdičkův roztok v nádobce se vzorkem nebyl při měřeních chlazen, proto byl měněn po každém měření. Je tedy žádoucí používat co nejmenší množství Brdičkova roztoku. Množství 2 ml je dostatečné pro ponoření všech tří elektrod v nádobce. Vzorky byly vždy v množství 5 μl smíchány s 1995 μl Brdičkova roztoku. Plocha rtuťové kapky byla 0,4 mm^2 . Po každém měření bylo odkápnuto několik kapek, aby byl povrch kapky dokonale hladký (narušení povrchu je způsobeno stíráním rtuťové kapky s změřeným vzorkem s pracovní elektrodou). Délka akumulace vzorku na rtuťovou kapku byla 240 s. Probublávání elektrolytu argonem pro vytěsnění kyslíku není nutné provádět.

Parametry diferenční pulzní polarografie jsou: potenciál depozice vzorku 0 V, rozsah potenciálů je od 0,7 V do 1,85 V s krokem 0,00503 V. Modulační amplituda (velikost impulzu) je 0,02505 V a modulační čas (délka impulzu) je 0,05 s.

7.2. Měření interakcí thiolů se selenem

BRDIČKOVA REAKCE

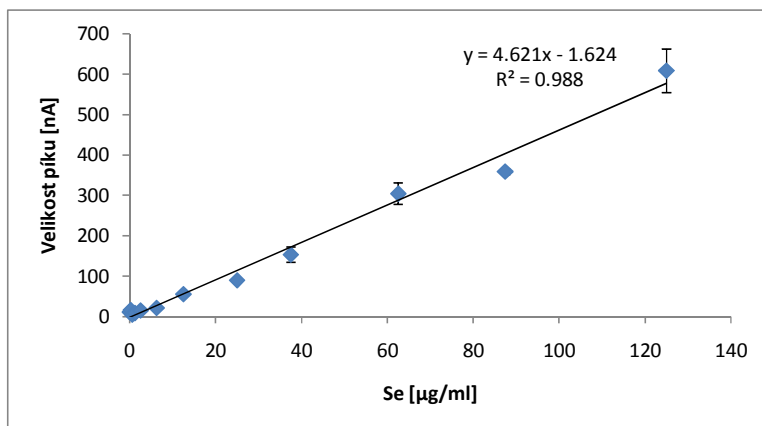
Před každou sérií měření byl změřen základní elektrolyt (Brdičkův roztok). Voltamogram základního elektrolytu je na Obr. 10.



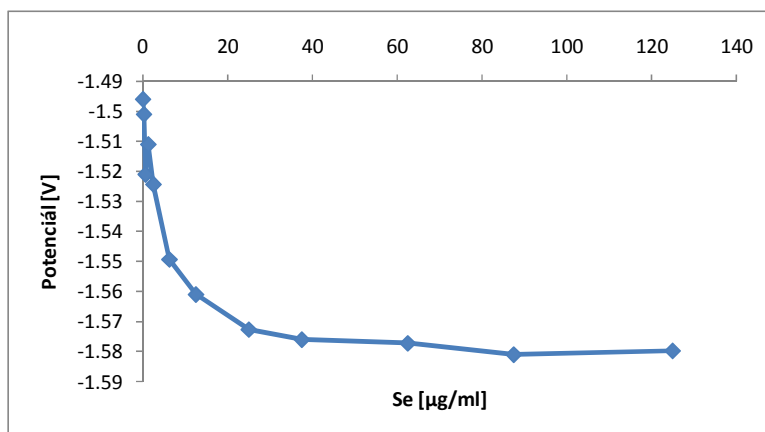
Obr. 10 – Voltamogram základní elektrolytu – Brdičkova roztoku

KALIBRAČNÍ GRAF PRO SELEN

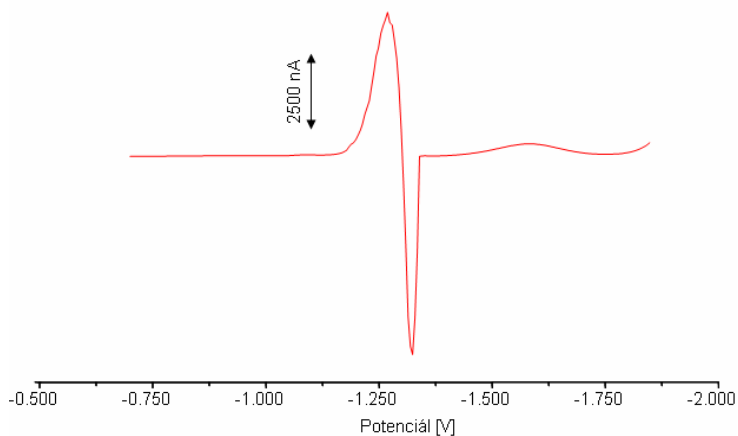
Velikost Cat2 píku s vzrůstající koncentrací selenu lineárně stoupá. Rovnice přímky je $y = 4,621x - 1,624$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,988$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací selenu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Kalibrační graf velikosti Cat2 píků selenu je na Obr. 11, potenciály Cat2 píků selenu na Obr. 12 a ukázka voltamogramu pro selen je na Obr. 13.



Obr. 11 – Kalibrační graf velikosti Cat2 píků selenu



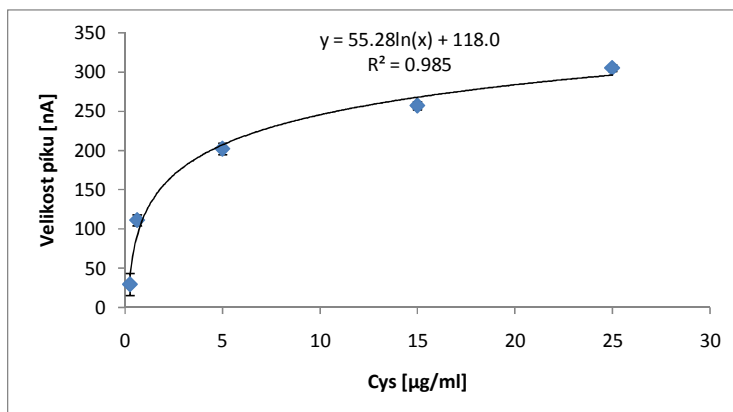
Obr. 12 – Potenciály Cat2 píků selenu



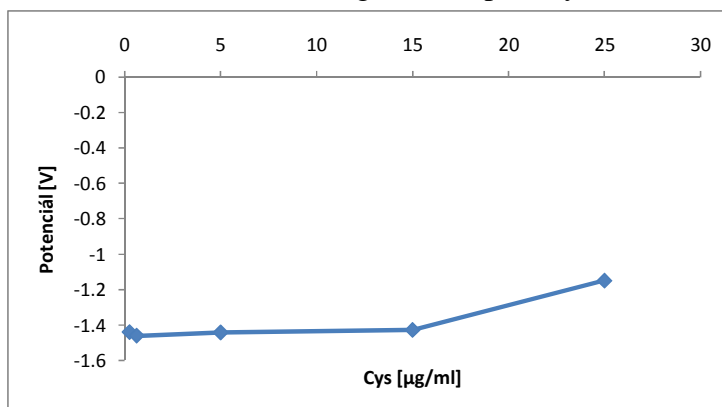
Obr. 13 – Ukázka voltamogramu pro selen; $Se = 87,5 \mu\text{g/ml}$

KALIBRAČNÍ GRAF PRO CYSTEIN

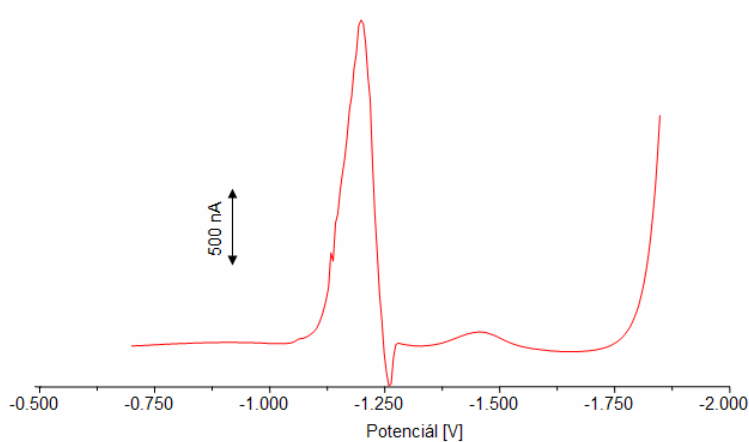
Velikost Cat2 píku s vzrůstající koncentrací cysteinu logaritmicky stoupá. Rovnice logaritmického proložení je $y = 55,28\ln(x) + 118,0$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,985$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací cysteinu stoupají, jedná se tedy o děj limitně difúzní. Kalibrační graf velikosti Cat2 píků cysteinu je na Obr. 14, potenciály Cat2 píků cysteinu na Obr. 15 a ukázka voltamogramu pro cystein je na Obr. 16.



Obr. 14 – Kalibrační graf Cat2 píků cysteinu



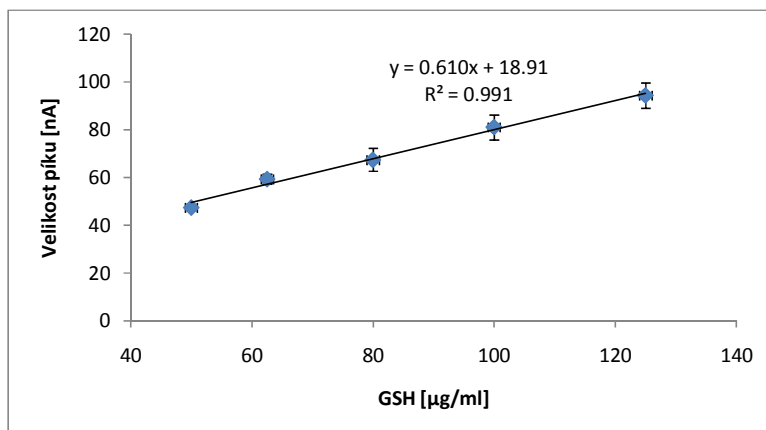
Obr. 15 – Potenciály Cat2 píků cysteinu



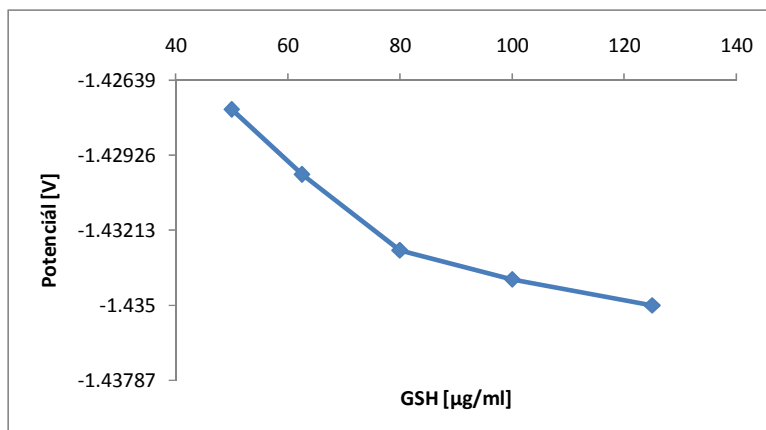
Obr. 16 – Ukázka voltamogramu pro cystein; Cys = 0,625 µg/ml

KALIBRAČNÍ GRAF PRO GLUTATHION

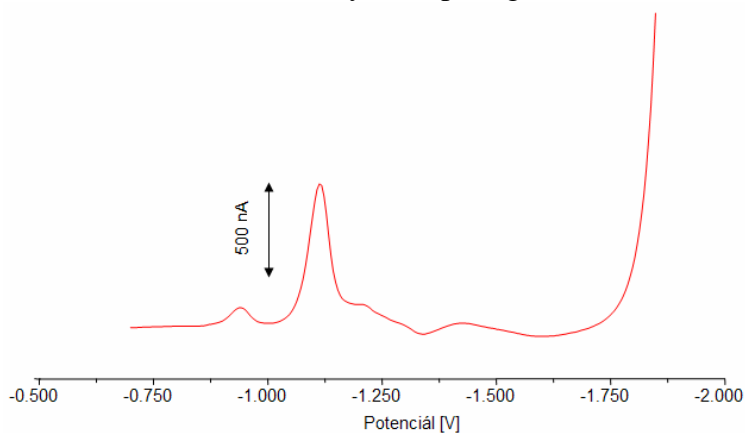
Velikost Cat2 píku s vzrůstající koncentrací glutathionu lineárně stoupá. Rovnice přímky je $y = 0,610x + 18,91$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,991$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací glutathionu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Kalibrační graf velikosti Cat2 píků glutathionu je na Obr. 17, potenciály Cat2 píků glutathionu na Obr. 18 a ukázka voltamogramu pro glutathion je na Obr. 19.



Obr. 17 - Kalibrační graf Cat2 píků glutathionu



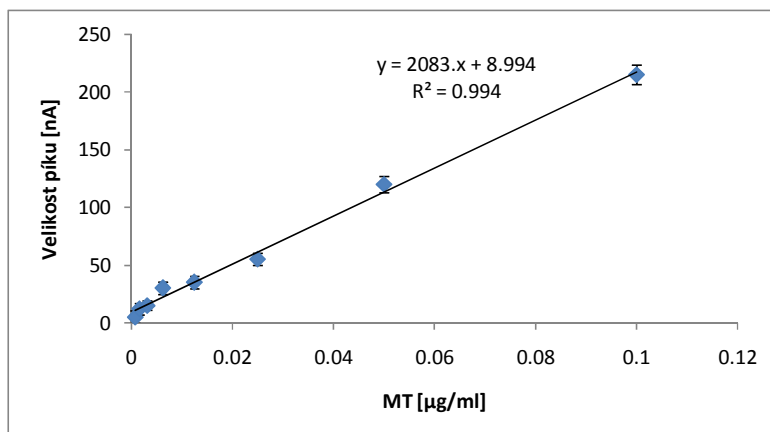
Obr. 18 - Potenciály Cat2 píků glutathionu



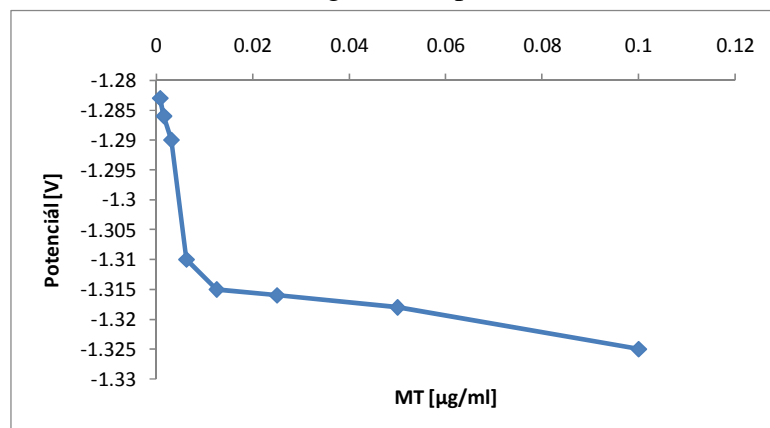
Obr. 19 - Ukázka voltamogramu pro glutathionu; GSH = 62,5 μg/ml

KALIBRAČNÍ GRAF PRO METALOTHIONEIN

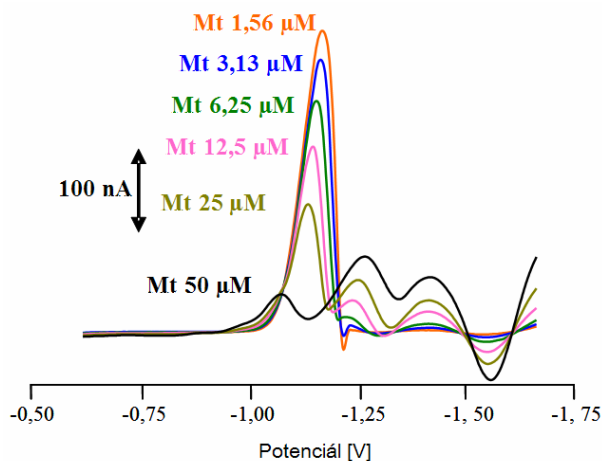
Velikost Cat2 píku s vzrůstající koncentrací metalothioneinu lineárně stoupá. Rovnice přímky je $y = 2083x + 8,994$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,994$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací metalothioneinu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Kalibrační graf velikosti Cat2 píků metalothioneinu je na Obr. 20, potenciály Cat2 píků metalothioneinu na Obr. 21 a ukázky voltamogramů pro různá molární množství metalothioneinu jsou na Obr. 22.



Obr. 20 - Kalibrační graf Cat2 píků metalothioneinu



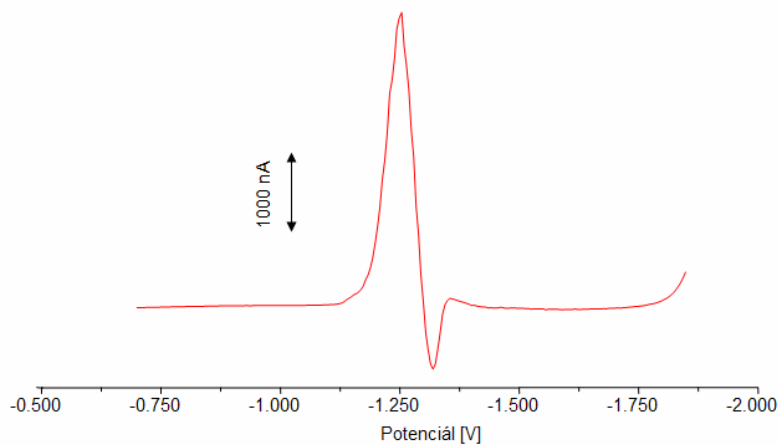
Obr. 21 - Potenciály Cat2 píků metalothioneinu



Obr. 22 - Ukázka voltamogramu pro metalothionein; MT = 0,025 μg/ml

KALIBRAČNÍ GRAF PO FRAGMENT METALOTHIONEINU

Kalibrační graf pro fragment metalothioneinu (sekvence aminokyselin: KCCCSCCPVG), nebylo možno sestrotit, neboť Cat2 píky voltamogramů nebyly jednoznačně vyhodnotitelné. Ukázka voltamogramu pro fragment metalothioneinu je na Obr. 23.

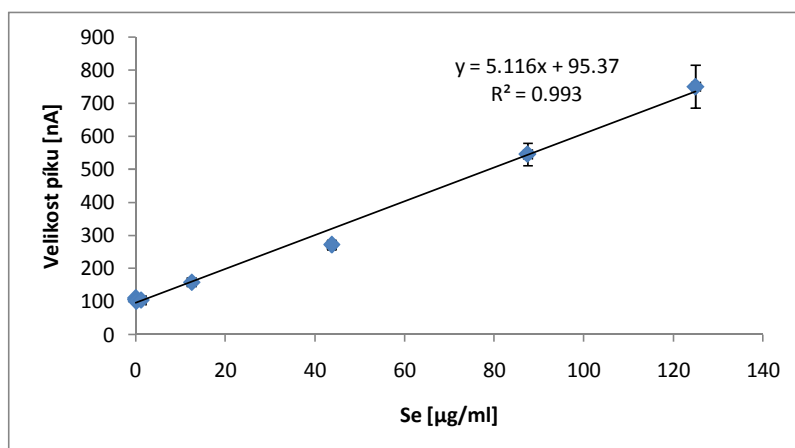


Obr. 23 – Ukázka voltamogramu pro fragment metalothioneinu; fragment MT = 0,05 $\mu\text{g/ml}$

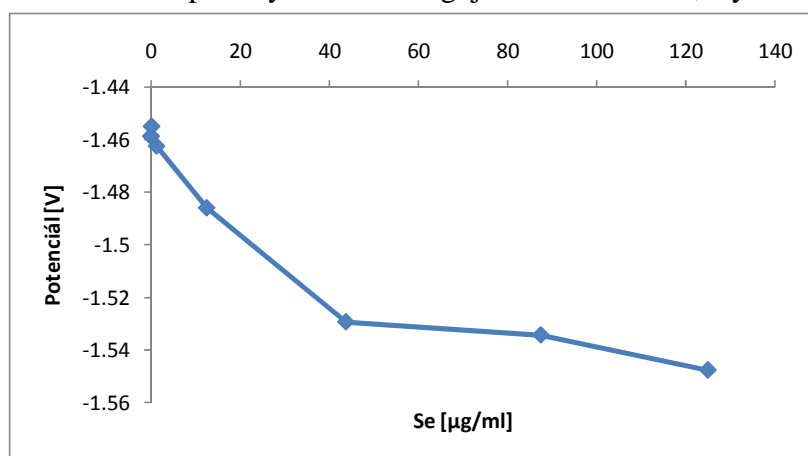
MĚŘENÍ INTERAKCE SELENU A CYSTEINU

Velikost Cat2 píkú selenu interagujícího s cysteinem s konstantním množstvím cysteinu ($Cys = 0,625 \mu\text{g/ml}$) s vzrůstající koncentrací selenu lineárně stoupá. Rovnice přímky je $y = 5,116x + 94,37$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,993$. Potenciály píkú s vzrůstající koncentrací selenu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Graf velikosti Cat2 píkú selenu interagujícího s cysteinem je na Obr. 24, potenciály Cat2 píkú na Obr. 25.

Při nejvyšších koncentracích selenu a cysteinu došlo po několika hodinách od namíchání vzorků ke zbarvení vzorků do žluta, zbarvení ale nebylo příliš výrazné.

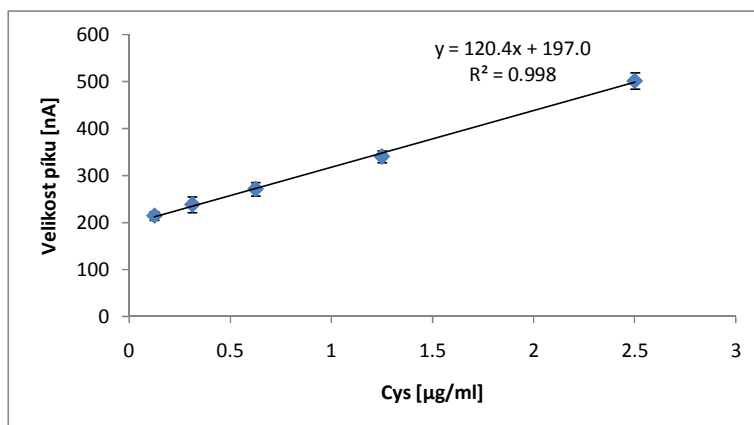


Obr. 24 – Velikost Cat2 píkú cysteinu interagujícího se selenem; $Cys = 0,625 \mu\text{g/ml}$

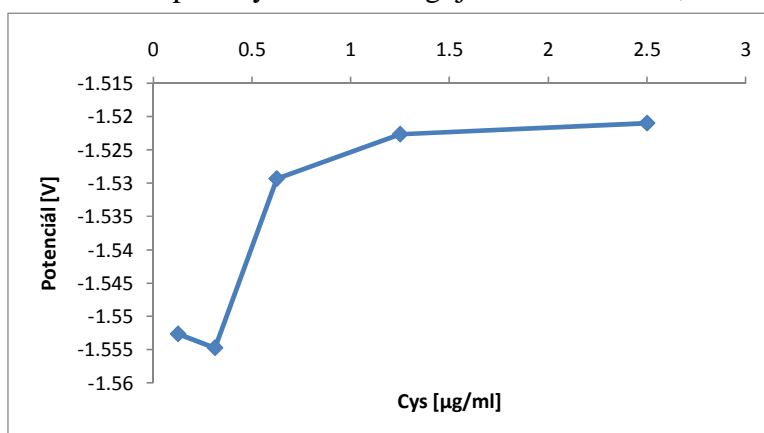


Obr. 25 – Potenciály Cat2 píkú cysteinu interagujícího se selenem; $Cys = 0,625 \mu\text{g/ml}$

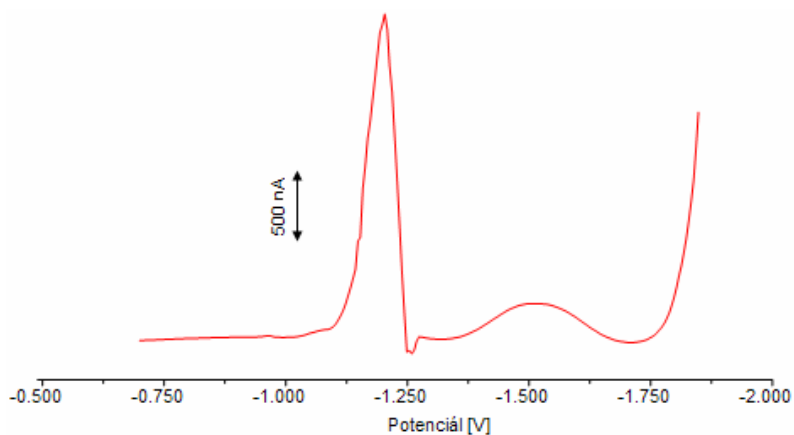
Velikost Cat2 píku selenu interagujícího s cysteinem s konstantním množstvím selenu (Se = 43,75 $\mu\text{g/ml}$) s vzrůstající koncentrací cysteinu lineárně stoupá. Rovnice přímky je $y = 120,4x + 197,00$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,998$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací selenu stoupají, jedná se tedy o limitně difúzní děj. Graf velikosti Cat2 píků je na Obr. 26, potenciály Cat2 píků na Obr. 27 a ukázka voltamogramu je na Obr. 28.



Obr. 26 - Velikost Cat2 píků cysteinu interagujícího se selenem; Se = 43,75 $\mu\text{g/ml}$



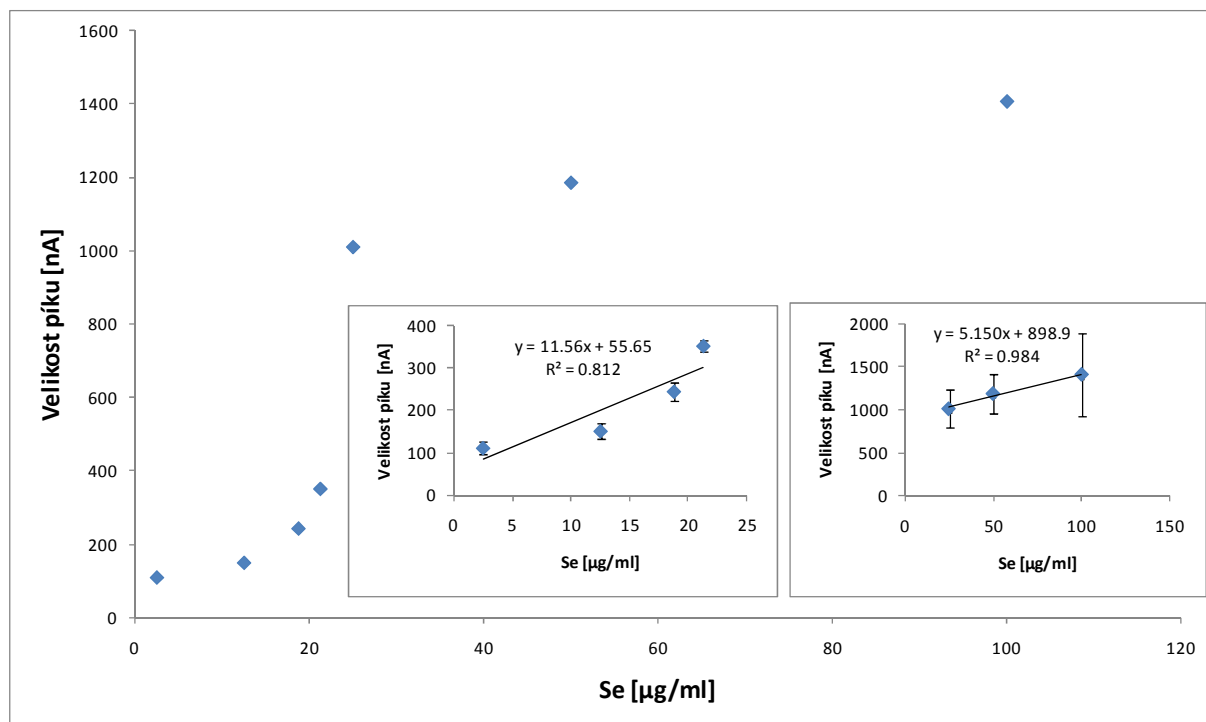
Obr. 27 - Potenciály Cat2 píků cysteinu interagujícího se selenem; Se = 43,75 $\mu\text{g/ml}$



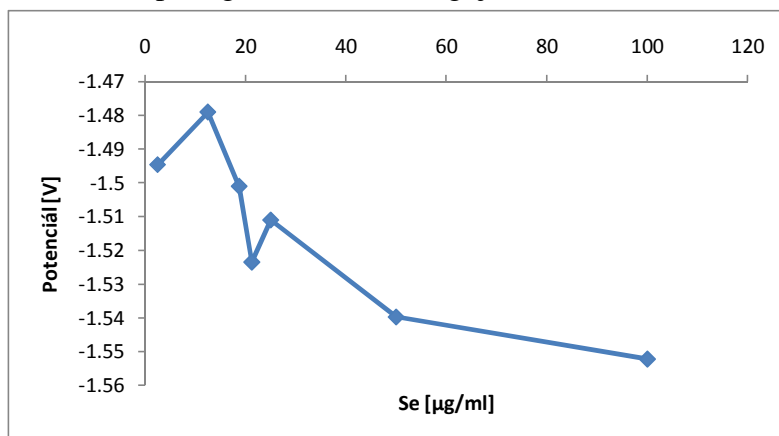
Obr. 28 – Voltamogram cysteinu interagujícího se selenem; Cys = 0,625 $\mu\text{g/ml}$,
Se = 43,75 $\mu\text{g/ml}$

MĚŘENÍ INTERAKCE SELENU A GLUTATHIONU

Velikost Cat2 píku selenu interagujícího s glutathionem s konstantním množstvím glutathionu (GSH = 125 $\mu\text{g/ml}$) s vzrůstající koncentrací glutathionu stoupá. Při koncentraci Se = 25 $\mu\text{g/ml}$ dojde ke skokovému nárůstu velikosti Cat2 píků. Rovnice přímky před touto skokovou změnou je $y = 11,56x + 55,65$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,812$. Rovnice přímky po této skokové změně je $y = 5,15x + 898,9$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,984$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací selenu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Graf velikosti Cat2 píků selenu interagujícího s glutathionem je na Obr. 29, potenciály Cat2 píků na Obr. 30.



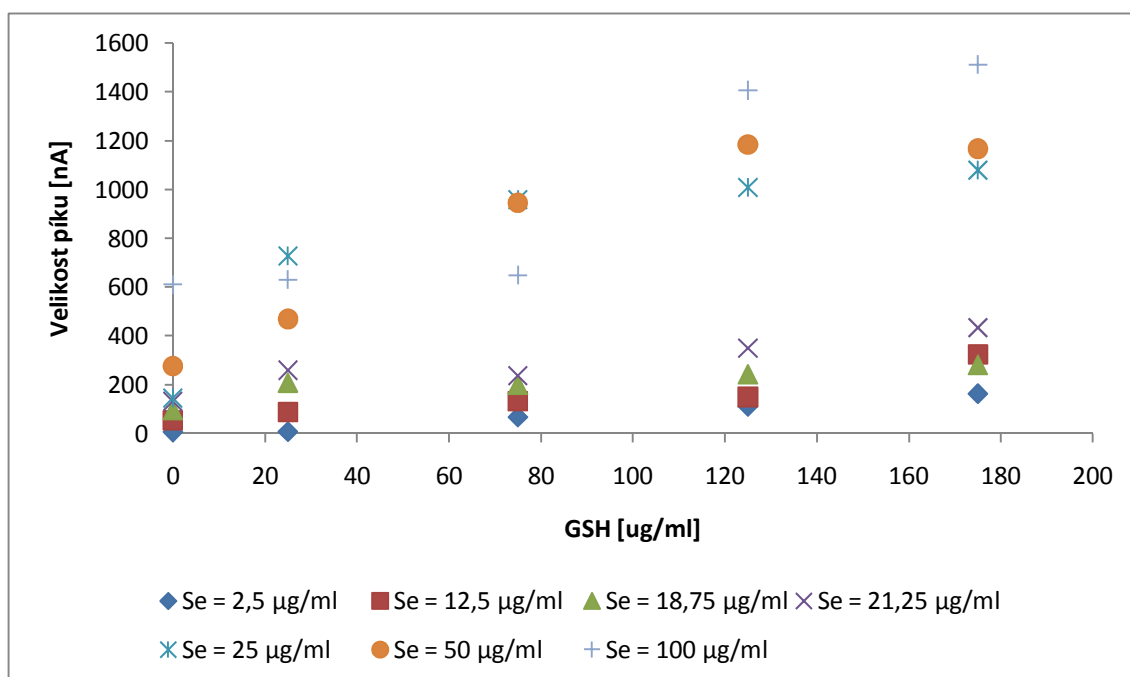
Obr. 29 - Velikost Cat2 píků glutathionu interagujícího se selenem; GSH = 125 $\mu\text{g/ml}$



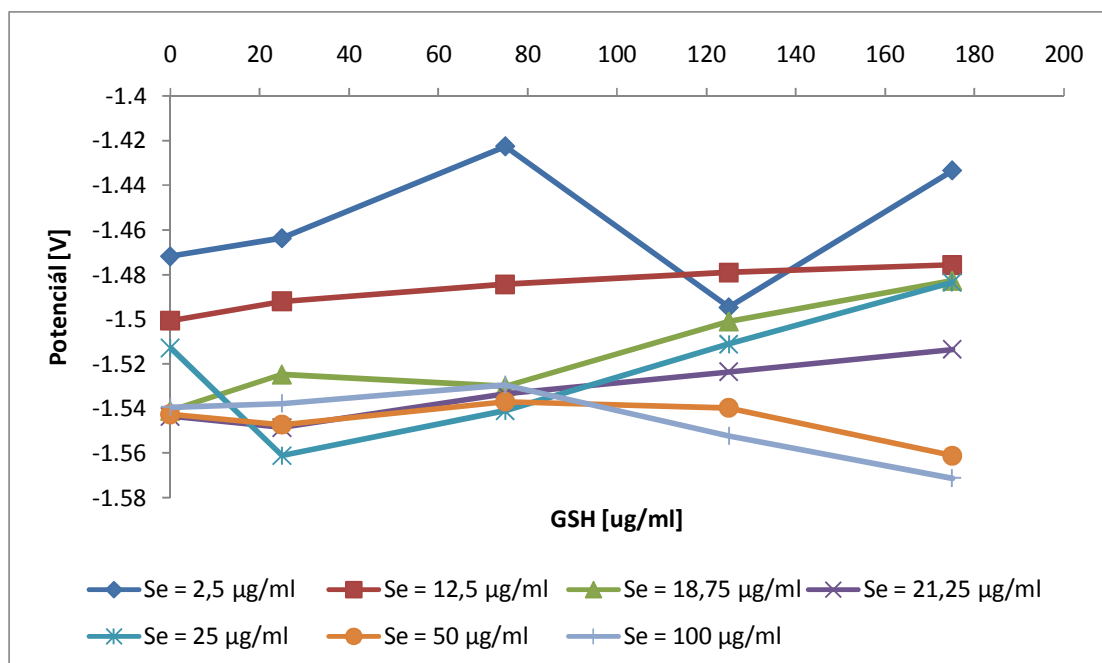
Obr. 30 - Potenciály Cat2 píků glutathionu interagujícího se selenem; GSH = 125 $\mu\text{g/ml}$

Velikost Cat2 píkú selenu interagujícího s glutathionem za různých koncentrací těchto analytů s vzrůstajícími koncentracemi těchto látek stoupá. Rovnice přímek a faktory spolehlivosti pro jednotlivá měření při lineárním proložení jsou uvedeny v Tab. 2. Graf velikosti Cat2 píkú za různých koncentrací selenu a glutathionu je na Obr. 31, potenciály Cat2 píkú na Obr. 32 a ukázka voltamogramu je na Obr. 33.

Lze vypořovat, že do koncentrace selenu $\text{Se} = 21,25 \mu\text{g/ml}$ velikosti Cat2 píkú stoupají pozvolně, ale při koncentraci selenu $\text{Se} = 25 \mu\text{g/ml}$, velikosti Cat2 píkú začnou stoupat velmi výrazně. Ovšem od těchto vyšších koncentrací selenu není nárůst Cat2 píkú, v závislosti na nárůstu koncentrace selenu, lineární. Namíchaný vzorek selenu a glutathionu se téměř ihned zbarvoval do výrazně červené barvy. Zajímavé bylo, že při nejvyšších namíchaných koncentracích selenu a glutathionu ke zbarvení došlo až po cca. 10 minutách a nebylo tak výrazné, což by mohlo korespondovat s nelineárními průběhy při vyšších koncentracích selenu. Potenciály píkú s měnící se mi koncentracemi těchto látek měli stoupající i klesající tendenci, jedná se tedy o kinetický děj.



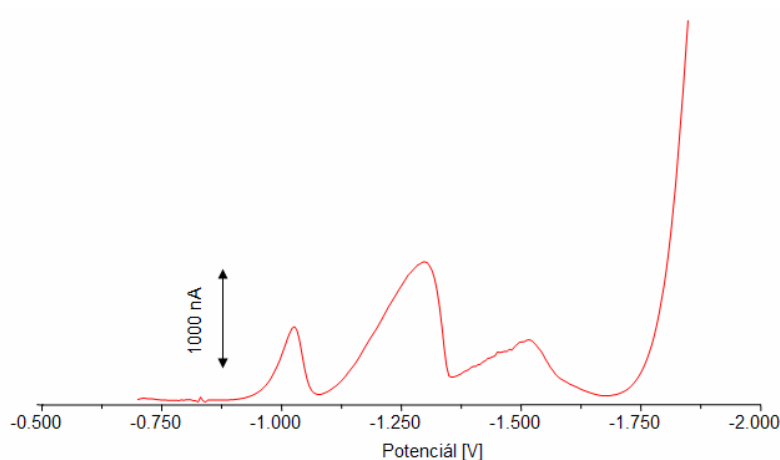
Obr. 31 - Graf velikosti Cat2 píkú za různých koncentrací selenu a glutathionu



Obr. 32 - Potenciály Cat2 píků za různých koncentrací selenu a glutathionu

Tab. 2 - Rovnice přímků a faktory spolehlivosti glutathionu interagujícího se selenem za různých koncentrací těchto analytů a při lineárním proložení

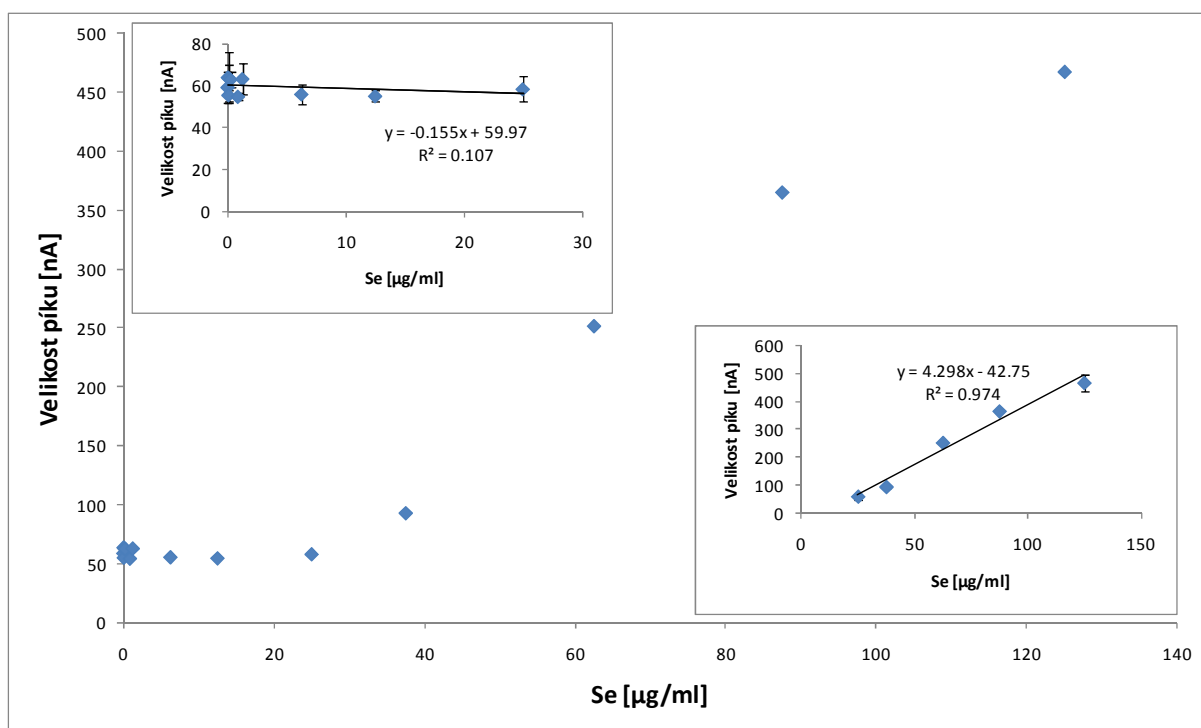
Se [µg/ml]	směrnice přímků	faktor spolehlivosti R^2
2,5	$0,934x - 3,030$	0,985
12,5	$1,343x + 43,45$	0,858
18,75	$0,853x + 139$	0,781
21,25	$1,505x + 163,8$	0,886
25	$4,463x + 427,2$	0,704
50	$5,433x + 374$	0,883
100	$5,855x + 492,3$	0,847



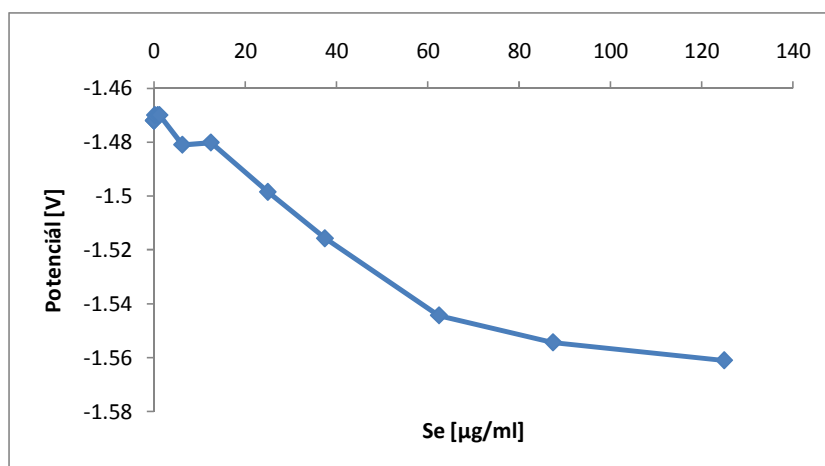
Obr. 33 - Voltamogram glutathionu interagujícího se selenem; GSH = 125 µg/ml, Se = 40 µg/ml

MĚŘENÍ INTERAKCE SELENU A METALOTHIONEINU

Velikost Cat2 píku selenu interagujícího s metalothioneinem s konstantním množstvím metalothioneinu ($MT = 0,025 \mu\text{g/ml}$) s vzrůstající koncentrací metalothioneinu je nejprve bez výraznějších změn, při koncentracích selenu od $Se = 25 \mu\text{g/ml}$ začne lineárně stoupat. Rovnice přímky pro oblast bez výraznějších změn velikosti Cat2 píků je $y = -0,155x + 59,97$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,107$. Rovnice přímky pro oblast stoupání velikosti Cat2 píků je $y = 4,298x - 42,75$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,974$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací selenu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Graf velikosti Cat2 píků selenu interagujícího s metalothioneinem je na Obr. 34, potenciály Cat2 píků na Obr. 35.

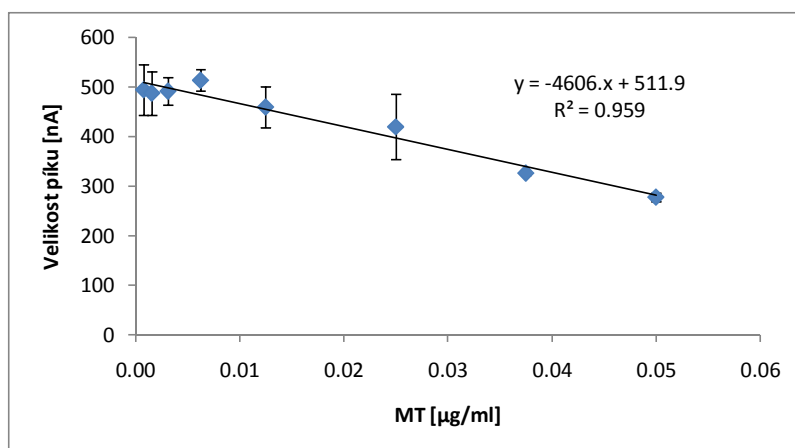


Obr. 34 - Velikost Cat2 píků metalothioneinu interagujícího se selenem; $MT = 0,025 \mu\text{g/ml}$; dále grafy rozdělují měření na část bez výrazných změn velikosti Cat2 píků a část lineárně stoupající

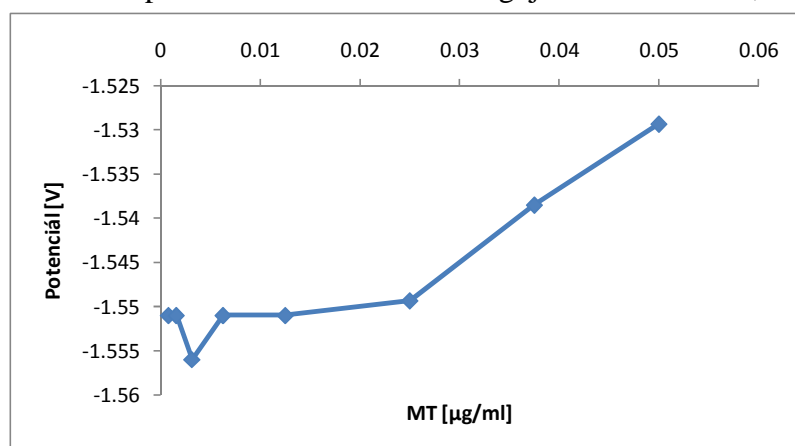


Obr. 35 - Potenciály Cat2 píků metalothioneinu interagujícího se selenem; $MT = 0,025 \mu\text{g/ml}$

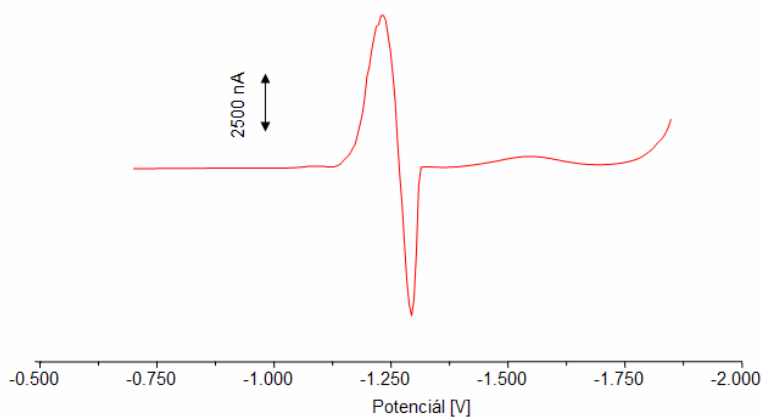
Velikost Cat2 píku selenu interagujícího s metalothioneinem s konstantním množstvím selenu ($Se = 87,5 \mu\text{g/ml}$) s vzrůstající hodnotou metalothioneinu lineárně klesá. Rovnice přímky je $y = -4606x + 5111,9$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,959$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací selenu stoupají, jedná se tedy o limitně difúzní děj. Graf velikosti Cat2 píků je na Obr. 36, potenciály Cat2 píků na Obr. 37 a ukázka voltamogramu je na Obr. 38.



Obr. 36 - Velikost Cat2 píků metalothioneinu interagujícího se selenem; $Se = 87,5 \mu\text{g/ml}$



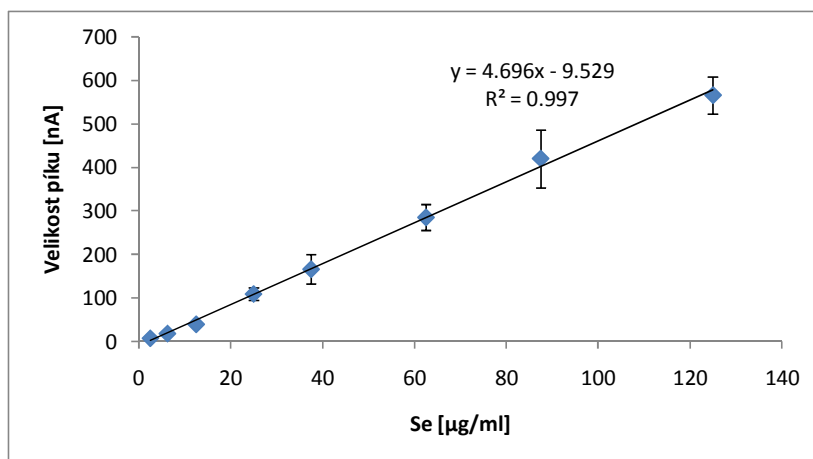
Obr. 37 - Potenciály Cat2 píků metalothioneinu interagujícího se selenem; $Se = 87,5 \mu\text{g/ml}$



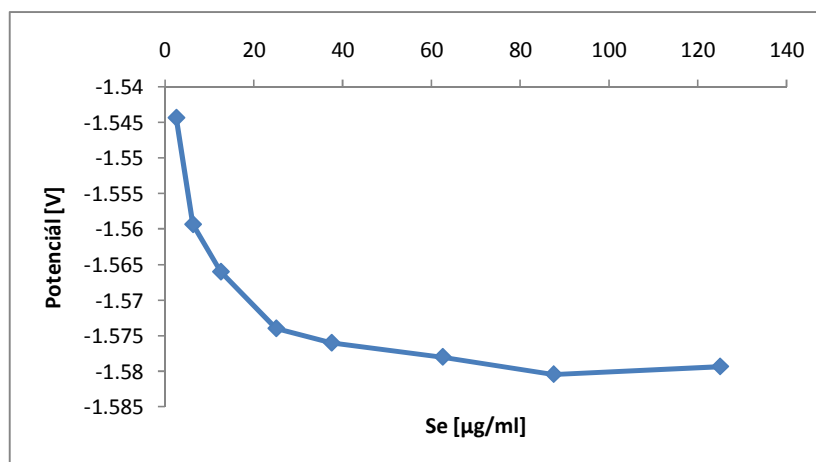
Obr. 38 - Voltamogram metalothionein interagujícího se selenem; $MT = 0,025 \mu\text{g/ml}$, $Se = 87,5 \mu\text{g/ml}$

MĚŘENÍ INTERAKCE SELENU A FRAGMENTU METALOTHIONEINU

Velikost Cat2 píků selenu interagujícího s fragmentem metalothioneinu (sekvence aminokyselin: KCCCSCCPVG) s konstantním množstvím fragmentu metalothioneinu (fragment MT = 0,05 $\mu\text{g/ml}$) s vzrůstající koncentrací selenu lineárně stoupá. Rovnice přímky je $y = 4,696x - 9,529$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,997$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací selenu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Graf velikosti Cat2 píků selenu interagujícího s cysteinem je na Obr. 39, potenciály Cat2 píků na Obr. 40.

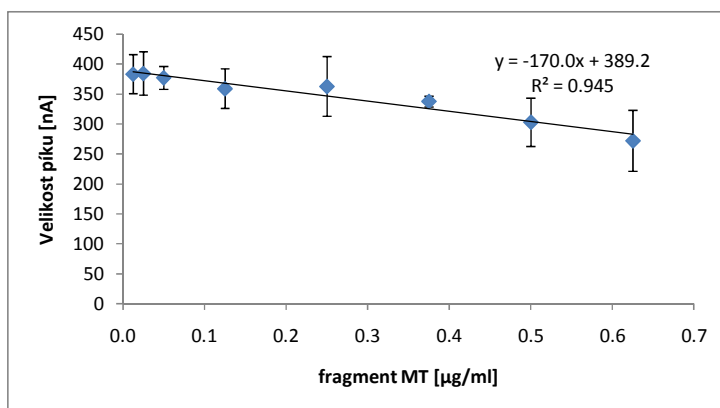


Obr. 39 - Velikost Cat2 píků fragmentu metalothioneinu interagujícího se selenem; fragment MT = 0,05 $\mu\text{g/ml}$

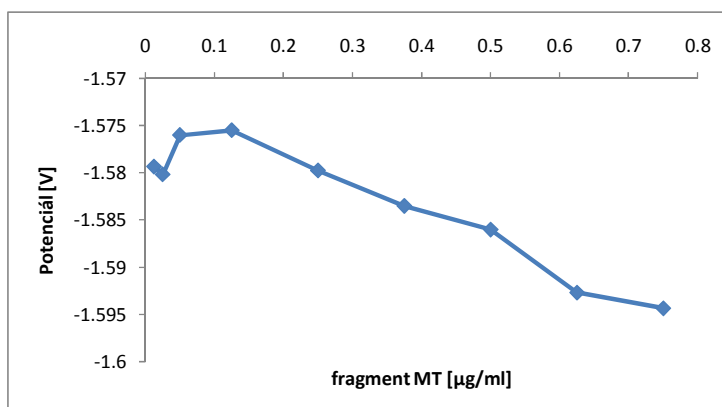


Obr. 40 - Potenciály Cat2 píků fragmentu metalothioneinu interagujícího se selenem; fragment MT = 0,05 $\mu\text{g/ml}$

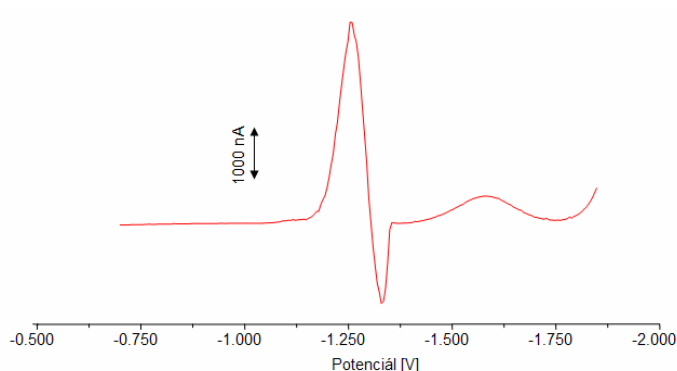
Velikost Cat2 píku selenu interagujícího s fragmentem metalothioneinu s konstantním množstvím selenu ($\text{Se} = 87,5 \mu\text{g/ml}$) s vzrůstající koncentrací fragmentu metalothioneinu lineárně klesá. Rovnice přímky je $y = -170,0x + 398,2$ a faktor spolehlivosti je $R^2 = 0,945$. Potenciály píků s vzrůstající koncentrací selenu klesají, jedná se tedy o adsorpční děj. Graf velikosti Cat2 píků selenu interagujícího s cysteinem je na Obr. 41, potenciály Cat2 píků na Obr. 42 a ukázka voltamogramu je na Obr. 43.



Obr. 41 - Velikost Cat2 píku fragmentu metalothioneinu interagujícího se selenem;
 $\text{Se} = 87,5 \mu\text{g/ml}$



Obr. 42 – Potenciály Cat2 píku fragmentu metalothioneinu interagujícího se selenem;
 $\text{Se} = 87,5 \mu\text{g/ml}$



Obr. 43 - Voltamogram fragmentu metalothionein interagujícího se selenem;
fragment MT = $0,05 \mu\text{g/ml}$, $\text{Se} = 87,5 \mu\text{g/ml}$

SHRnutí ELEKTOCHEMICKÝCH PRŮBĚHŮ MĚŘENÝCH ANALYTŮ

Shrnutí elektrochemických průběhů měřených analytů je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3 - Porovnání směrnic proložení měření jednotlivých analytů a jejich interakcí a potenciálové děje

Analyty	Směrnice proložení	Potenciálový děj
Selen	4,621x	Adsorpční
Cystein	55,28ln(x)	Limitně difúzní
Glutathion	0,610x	Adsorpční
Metalothionein	2083x	Adsorpční
Cystein+Selen; Cys = konst.	5,116x	Adsorpční
Cystein+Selen; Se = konst.	120x	Limitně difúzní
Glutathion+Selen; GSH = konst. *	5,15x	Adsorpční
Glutathion+Selen; Se = konst. **	5,855x	Kinetický
Metalothionein+Selen; MT = konst. ***	4,298x	Adsorpční
Metalothionein+Selen; Se = konst.	-4606x	Limitně difúzní
Fragment MT+Selen; Fragment MT = konst.	4,696x	Adsorpční
Fragment MT+Selen; Se = konst.	-170x	Adsorpční

* rovnice přímky po skokové změně průběhu, viz. Obr. 29

** vybráno pro Se = 100 µg/ml, viz Tab. 2

*** pro stoupající část závislosti interakcí, viz. Obr. 34

Jak již bylo popsáno v Kap. 4.2., vznik Cat2 píku je pravděpodobně způsoben redukcí H⁺ iontů z reakce mezi R(SH)₂ a [Co(H₂O)₆]²⁺ na povrchu rtuťové elektrody. Z měření vyplývá, že i selen (Na₂SeO₃) způsobuje vznik Cat2 píku. Avšak mechanismus vzniku Cat2 píku, musí být v tomto případě jiný, než jaký byl popsán v Kap. 4.2.

Cystein jako jediný analyt v měřeních měl logaritmickou závislost velikosti Cat2 píků na své koncentraci. Stejně tak, jako jediný analyt měl limitně difúzní potenciálový děj. Zajímavé je porovnání glutathionu a metalothioneinu. Oba tyto analyty mají své hodnoty proloženy přímkou a oba mají potenciálové děje adsorpční. Také procentuální zastoupení cysteinových zbytků mají oba analyty přibližně stejné, jelikož glutathion se skládá ze 3 aminokyselinových zbytků, z nichž 1 je cysteinový zbytek a metalothionein se skládá z 61 aminokyselinových zbytků, z nichž 20 je cysteinovými zbytky. Přesto směrnice metalothioneinu je o několik řádů vyšší. To může jednak souviset s vyšší adsorbační tendencí metalothioneinu (porovnání Obr. 18 a Obr. 21), ale také je možné, že cysteinové zbytky se snáze redukují na povrchu rtuťové elektrody v rámci 1 molekuly metalothioneinu, než 2 molekul glutathionu.

Vzájemné interakce analytů jsou popsány v části interpretace výsledků, která je dále v této kapitole.

POČTY INTERAGUJÍCÍCH MOLEKUL

Hmotnost molekul se udává v Daltonech, které odpovídají jednotce g/mol. 1 Dalton je přibližně $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg. Ze známých hmotností jednotlivých molekul, pak lze určit počty interagujících molekul v jednotlivých měřeních. Molekulové hmotnosti a přepočty na kg jednotlivých měřených látek jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 – Přepočty hmotností měřených látek

Analyt	Molekulová hmotnost [Da]	Hmotnost [Kg]
Selen	78,96	$1,31 \cdot 10^{-25}$
Cystein	121	$2 \cdot 10^{-25}$
Glutathion	307	$5,31 \cdot 10^{-25}$
Metalothionein II	6042	$1 \cdot 10^{-23}$
Fragment metalothioneinu	1002	$1,66 \cdot 10^{-24}$

Z grafu závislosti velikosti Cat2 píků na interakci konstantní koncentrace metalothioneinu a proměnné koncentrace selenu (Obr. 34) je patrné, že při koncentraci MT = 0,025 µg/ml a Se = 25 µg/ml dojde v této závislosti ke zlomu. Do této koncentrace selenu se velikost Cat2 píků přibližně nemění, při dalším zvyšování selenu závislost začne lineárně stoupat. Po přepočtu této zlomové koncentrace na počty molekul vychází, MT = $2,5 \cdot 10^{12}$ molekul a Se = $1,91 \cdot 10^{17}$ atomů. Poměr těchto látek tedy je 76400 atomů selenu na 1 molekulu metalothioneinu.

Pokud se do tohoto výpočtu vloží fakt, že jedna molekula metalothioneinu obsahuje 20 cysteinových zbytků, vychází poměr 1 cysteinový zbytek na 3820 atomů selenu. V běžně koncipovaných in vitro interakčních studiích se poměr interagujících molekul provádí v poměru 1:1000 [109], což je i tento případ. Může se tedy konstatovat, že metalothionein reaguje se selenem a může být považován za nový způsob metabolizace tohoto prvku.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Zvyšující se koncentrace všech měřených thiolů i selenu, zvyšovali velikost Cat2 píku měřených voltamogramů. Všechny tyto látky mimo cystein vykazovali lineární závislost koncentrace na velikosti Cat2 píků. U cysteinu byla tato závislost logaritmická.

Při interakcích cysteinu a selenu, nebyla na výsledném voltamogramu patrna žádná katalytická reakce. Průběhy velikostí Cat2 píku a potenciálové děje přibližovali tomu analytu, jehož koncentrace byla měněna.

Při interakcích glutathionu a selenu docházelo k výraznému červenému zbarvení. Při nižších koncentracích selenu byly nárůsty Cat2 píků lineární, bez patrné katalytické reakce. Po zvýšení selenu nad určitou hranici (25 $\mu\text{g/ml}$), kdy dochází k výraznému nárůstu píků, zřejmě dochází ke katalytické reakci mezi glutathionem a selenem. Z průběhů grafů pak vyplývá, že k těmto reakcím začíná docházet pouze v závislosti na koncentraci selenu, nikoli poměru glutathionu a selenu.

Při interakcích metalothioneinu a selenu bylo patrné, že velikost Cat2 píků klesá se vzrůstající koncentrací metalothioneinu. Je tedy pravděpodobné, že metalothionein na sebe váže selen, což vysvětluje klesající tendenci Cat2 píků. Naopak, při stoupající koncentraci selenu je velikost Cat2 píků přibližně stále stejná, a po překročení určitého poměru selenu ku metalothioneinu začne docházet k vzrůstu velikosti Cat2 píků. Směrnice přímky této lineárně stoupající části grafu je pak téměř shodná se směrnicí přímky kalibračního grafu selenu, viz. Obr. 11, Obr. 34 a Tab. 3. Z toho lze usoudit, že metalothionein, již není schopen interagovat s dalšími atomy selenu. Tento zlom v průběhu nastává při koncentracích $\text{MT} = 0,025 \mu\text{g/ml}$ a $\text{Se} = 25 \mu\text{g/ml}$. Po přepočtu hmotností vychází poměr 76400 atomů selenu na 1 metalothionein. Takto ovšem nelze přesně určit, kolik na sebe váže metalothionein atomů selenu.

Při interakcích fragmentu metalothioneinu a selenu bylo patrné obdobné chování jako u metalothioneinu. Se zvyšující se koncentrací fragmentu metalothioneinu docházelo ke snižování velikosti Cat2 píků, ovšem s mnohem mírnější tendencí než jak tomu bylo u metalothioneinu, viz. Obr. 36, Obr. 41 a Tab. 3. Při zvyšování koncentrace selenu docházelo ke zvyšování velikosti Cat2 píků, znovu s přibližně stejnou směrnicí přímky jako u kalibračního grafu pro selen, viz. Obr. 11, Obr. 39 a Tab. 3. Lineární nestoupající část, která byla pozorována u metalothioneinu zde nebyla patná, lze ale předpokládat, že by k ní docházelo při velmi malých koncentracích selenu. Fragment metalothioneinu se tak pravděpodobně chová obdobně jako metalothionein, ale není ve svých interakcích tak účinný.

8. Závěr

Byly zkoumány interakce anorganicky vázaného selenu s biologicky aktivními thioley. Jednalo se o cystein, glutathion, metalothionein a fragment metalothioneinu. Ke studiu interakcí bylo využito diferenční pulzní polarografie. Z naměřených průběhů vyplívají následující interakce. Mezi selenem a cysteinem pravděpodobně k žádným interakcím nedochází. Mezi selenem a glutathionem dochází ke katalytickým reakcím při vysokých koncentracích selenu. Metalothionein na sebe pravděpodobně váže selen. Obdobně i fragment metalothioneinu na sebe váže selen, ale s menší účinností.

Seznam použité literatury

- [1] REILLY, C. Selenium in food and health. *Blackie Academic and Professional*, 1996.
- [2] BAUER, F. Selenium and Soils in the Western United States. *Electronic Green Journal*, 1997
- [3] FRANKLYN Julian a kol. *A Survey of the Occult*. 2001. ISBN 1-84327-087-0
- [4] BERZELIUS J. J. Additional Observations on Lithion and Selenium. *Annals of Philosophy*, 1818. vol. 11, p. 373.
- [5] JORPES, J. E. Berzelius: his life and work. 1970 : University of California Press.
- [6] WEEKS M. E. The discovery of the elements. VI. Tellurium and selenium. *Journal of Chemical Education*, 1932, vol 9, no. 3, p. 474.
- [7] RINGNES, V. Origin of the Names of Chemical Elements. *Journal of Chemical Education*, 1989, p. 731.
- [8] NEWTON, D. E. *Chemical elements*, 2010, vol. 2.
- [9] OLDFIELD J. E. A brief history of selenium research: From alkali disease to prostate cancer (from poison to prevention). *American Society of Animal Science*, 2002.
- [10] SCHWARZ K., FOLTZ C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 1957.
- [11] DOSTÁL J. *Biochemie pro bakaláře*. 2005, Brno-Kraví Hora: Vydavatelství MU.
- [12] RAYMAN M. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 2000, vol. 356, p. 233-241.
- [13] ARTHUR J.R., MCKENZIE R. C., BECKETT, G. J. Selenium in the Immune System. *Journal of Nutrition*, 2003, vol. 133, p. 1457-1459.
- [14] KVÍČALA, J. Selen v antioxidantivní ochraně organismu. *Diabet. Metabol. Endokrin. Výživa*, 2001, vol. 4, p. 32-33.
- [15] MURRAY K. a kol. *Harprova Biochemie*. 2. vydání : Jinočany: H&, 1998. ISBN 80-85787-38-5
- [16] WASOWICZ W. The Role of Essential Elements in Oxidative Stress. *Comments on Toxicology*, 2003, vol. 9, p. 39-48.
- [17] IP C. Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention. *Journal of Nutrition*, 1998, vol. 128, p. 1845-1854.
- [18] ODEH R.M. CORNISH L. A. Natural Antioxidant for the prevention of Atherosclerosis. *Pharmacotherapy*, 1995, vol. 15, no. 5, p. 645-659.
- [19] COMBOS G. F. CLARK L.C. TURNBULL B. W. An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors*, 2001, vol. 14, p. 153-159.
- [20] FAJT Z. a kol. Selena jeho význam pro zdravotní stav prasat - revie. *Veterinářství*, 2009, vol. 4.

- [21] FRUSTACI A. a kol. Selenium- and zinc-deficient cardiomyopathy in human *intestinal malabsorption: preliminary results of selenium/zinc infusion*. *Heart Failure*, 2012, vol. 14, no. 1.
- [22] KVÍČALA J. Increase of Selenium Status of Inhabitants on Jindrichohradecko, South Bohemia. *Journal of Nutrition*, 2003, vol. 133, p. 203-282.
- [23] ZADAK Z. *Výživa v intenzivní péči*. 2002, Praha: Grada. ISBN 80-247-0320-3
- [24] YANG G. Endemic selenium intoxication of humans in China. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1983, vol. 35, p. 1076-1088.
- [25] SUNDE R. A. BOWMAN A. RUSEEL R. M. *Present Knowledge in nutrition*. 2001, Washington DC: ILSI Press.
- [26] HAWKES W. CH. ALKAN F.Z., OEHLER L. Absorption, Distribution and Excretion of Selenium from Beef and Rice in Healthy Nort American Men. *The Journal of Nutrition*, 2003, vol. 133, p. 3434-3442.
- [27] BARCELOUX D.G. Selenium. *Clinical Toxicology*, 1999, vol. 37, no. 2, p. 145-172.
- [28] WOLFFRAM S. a kol. Absorption a metabolism of selenium: difference between inorganic and organic sources. *Biotechnology in the Feed Industry*, 1999.
- [29] NAKAMURO K., OKUNO T. HASEGAWA T. Metabolism of Selenoamino Acids and Contribution of Selenium Methylation to Their Toxicity. *Journal of Health Science*, 2000, vol. 46, no. 6, p. 418-421.
- [30] LUTEN J. *Marine functional food*. 2009: Wageningen Academic Publisher. p. 174.
- [31] YAMING W. a kol. Effects of Selenium Dioxide on Apoptosis, Bcl-2 and p53 Expression, Intracellular Reactive Oxygen Species and Calcium Level in Three Human Lung Cancer Cell Lines. *Teh Chinese-German journal of clinical ontology*, 2004, vol. 3, no. 3, p. 141-146.
- [32] ARTEEL G.E., SIES H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2001, vol. 10, p. 153 – 158.
- [33] BURK R.F. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *Faseb Journal*, 1991, vol. 5, no. 9, p. 2274-2279.
- [34] DOLPH L. a kol. *Selenium Its Molecular Biology and Role in Human Health*. 2. vydání : Sprrineer. ISBN 0-387-33826-8
- [35] ROZSYPAL Stanislav, *Úvod do molekulární biologie*. 4. vydání 2006, Brno: Stanislav Rozsypal. ISBN 80-902562-5-2
- [36] BROWN K.M. ARTHUR J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition*, 2001, vol. 4, no. 2B, p. 593-599.
- [37] RÉGINE D. a kol. The Peroxiredoxin and Glutathione Peroxidase Families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 2008, vol. 179, no. 1, p. 41-57.
- [38] DONI M. G. a kol. Glutathione peroxidase, selenium, and prostaglandin synthesis in platelets. *American Physiological Society*, 1981.

- [39] CAO C. a kol. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Journal of biological chemistry*, 2003, vol. 278, no. 41, p. 39609–39614.
- [40] STEWART E. ASLUND J. F. BECKWITH J. Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *The EMBO Journal*, 1998, vol. 17, no. 19, p. 5543–5550.
- [41] LILLIG C., ARNE H. Thioredoxin and Related Molecules—From Biology to Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, vol. 9, no. 1, p. 25-47.
- [42] CONRAD M. a kol. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Molecular and Cell Biology*, 2004, vol. 24, no. 21, p. 9414–9423.
- [43] CHUNYING CH. a kol. The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure. *Environ Health Perspect*, 2006. vol. 114, no. 2, p. 297-301.
- [44] XU X. a kol. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochemical journal*, 2007. vol. 404, no. 1, p. 115-120.
- [45] SVOBODA J. a kol., *Organická chemie I*. 2005, Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha. ISBN 80-7080-561-7
- [46] RAY-PAILHADE, J. C. R. Acad. Sci., 1888, vol. 106, p. 1683-1694.
- [47] RAY-PAILHADE, J. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse, 1888, p. 173-180.
- [48] RAY-PAILHADE, J. C.R. Sess./Assoc. F. Av. Sci. Pt., 1893, vol. 1, p. 193.
- [49] RAY-PAILHADE, J. Bull. Gen. Ther. CLIV, 1907, p. 740-742.
- [50] HEFFTER A. Med. Naturwiss. Arch., 1908, vol. 1, p. 81-103.
- [51] HOPKINS F. G. *Journal of biological chemistry*, 1929, vol. 84, p. 269-320.
- [52] KENDALL E. C. MacKENZIE B. F. MASON, H. L. *Staff Meetings of the Mayo Clinic* 4, 1929, p. 264-266.
- [53] KENDALL E. C. MASON H. L. MacKENZIE, B. F., *Journal of biological chemistry*, 1930, vol. 88, p. 409-423.
- [54] SIMONI R. HILL R. VAUGHAN M. The Discovery of Glutathione by F. Gowland Hopkins and the Beginning of Biochemistry at Cambridge University. *Journal of biological chemistry*.
- [55] HOPKINS F.G. DIXON M. On Glutathione. II. A Thermostable Oxidation-Reduction System. *Journal of biological chemistry*, 1922, vol. 54, p. 527-563.
- [56] NOCTOR G. a kol. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 1998, vol. 49, p. 623-647.
- [57] MAY M. J. a kol. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 1998, kol. 49, p. 649-667.

- [58] MEISTER A., ANDERSON M. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 1983, vol. 52, p. 711–760.
- [59] MEISTER A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *Journal of biological chemistry*, 1988, vol. 263, p. 17205-1720.
- [60] EPP O., LADENSTEIN R., WENDEL A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *European journal of biochemistry*, 1983, vol. 133, no. 1, p. 51-69.
- [61] PAOLISSO G. a kol. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc*, 1998, vol. 46, no. 7, p. 833-838.
- [62] MASELLA R. a kol. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005, vol. 16, p. 577-586.
- [63] ROSSI R., MILZANI A., DALLE-DONN. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clinical chemistry*, 2002, vol. 48, p. 742-753.
- [64] DOSTÁLEK M. Oxidativní stres, biomarkery oxidativního stresu. *Postgraduální medicína*, 2007, vol. 4.
- [65] SHEEHAN D. a kol. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal*, 2001, vol. 360, p. 1-16.
- [66] WILCE M.C., PARKER M. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et biophysica acta*, 1994, vol. 1205, no. 1, p. 1-18.
- [67] HOLMGREN A. GLEASON F. Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*, 1988, vol. 4, no. 4, p. 271–297.
- [68] HOLMGREN A. Thioredoxin and glutaredoxin: small multi-functional redox proteins with active-site disulfide bonds. *Biochem Soc Trans*, 1988, vol. 16, no. 2, p. 95-96.
- [69] HOLMGREN A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, no. 24, p. 13963–13966.
- [70] HARBRECHT B. G. a kol. Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes. *Ann Surg.*, 1997, vol. 225, no. 1.
- [71] JAMES D. a kol. Amino Acid Transport in, Normal and Glutathione-Deficient Sheep Erythrocytes. *Biochemical Journal*, 1976, vol. 154, p. 43-48.
- [72] KAGI J., CHEN Y., EPSTEIN P.N. *Experientia Suppl.*, 1987, vol. 52, p. 25-61.
- [73] MARGOSHES M., VALLEE B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, vol. 79, no. 17, p. 4813-4814.
- [74] THIRUMOORTHY N. a kol. Metallothionein: An overview. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, vol. 13, no. 7, p. 993-996.
- [75] MARGOSHES M., VALLEE B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, vol. 79, no. 17, p. 4813-4814.

- [76] SCHAFFER A., KAGI J. H. R. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry*, 1988, vol 27, p. 8509-8515.
- [77] PETRLOVA J. a kol., Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta*, 2006, vol 51, p. 5112–5119
- [78] COYLE P.P. a kol. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002, vol. 4, no. 59, p. 627-647.
- [79] KŘÍŽKOVÁ S. a kol. Metallothionein - a promising tool for cancer diagnostics. *Bratislava Medical Journal*, 2009, vol. 110, no. 2, p. 93-97.
- [80] KUMARI M., V. HIRAMATSU., H. EBADI M. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radical Research*, 1988, vol. 29, no. 2, p. 93–101.
- [81] KANG Y.J., CHEN Y., EPSTEIN P. Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. *Journal of biological chemistry*, 1996, vol. 271, p. 12610–12616.
- [82] ABDEL-MAGEED A.B., AGRAWAL K. Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Research*, 1998. vol. 58, no. 11, p. 2335-2338.
- [83] BHARTI A.C., AGARWALL B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacology*, 2002, vol. 64, p. 883-888.
- [84] ZENG J. a kol. Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Letters*, 1991. vol. 279, no. 2, p. 310-312.
- [85] SCHOLZ F. *Electroanalytical Methods, Guide to Experiment and Applications*. 2002.
- [86] GALUS, Z. *Fundamentals of Electrochemical analysis*. Second Edition. 1994, Warsaw: Polish Scientific Publisher PWN.
- [87] KISSIMGER P. T. a HEINEMAN W. R. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, ed. S. Edition. 1996, New York.
- [88] SCHOLZ F., MEYER B. *Chemical Society reviews*, 1994, vol. 34.
- [89] BAREK J., OPEKAL.F., ŠTULÍK K. *Elektroanalytická chemie*. 2005: Univerzita Karlova.
- [90] KŮTA J., HEYROVSKÝ J. *Základy polarografie*, ed. Č. AV. 1962, Praha.
- [91] GARAJ J. a kol., *Fyzikalne a fyzikalnochemicke analyticke metody*, ed. V.t.a.e. literatury. 1977, Bratislava.
- [92] KŮTA J., KALVODA R. Moderní polarografické a voltametrické metody. *Chemické listy*, 1980, vol. 74, p. 674-693.
- [93] POSTBIEGLOVÁ I., PALEČEK E. Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1986, vol. 214, p. 359-371.

- [94] RASPOR B. Elucidation of the mechanism of the Brdička reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001, vol. 503, p. 159-162.
- [95]. RASPOR B. a kol. *Science of the Total Environment*, 2004, vol. 333, p. 99-108.
- [96] HÚSKA D. a kol. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2008, vol. 8, p. 1039-1047.
- [97] ZORITA I. a kol. *Biomarkers*, 2005. vol. 10, p. 342-359.
- [98] KUKACKA J. *Faseb Journal*, 2006. vol. 20, p. A75.
- [99] PETRLOVA J. a kol. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2007, vol. 127, p. 112-119.
- [100] VACEK J. a kol. *Bioelectrochemistry*, 2004, vol. 63, p. 347-351.
- [101] EL HOURCH M., DUDOIT A., AMIARD J. C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, vol. 378, p. 776-781.
- [102] DINIZ M. S. a kol. *Biomarkers*, 2007, vol. 12, p. 589-598.
- [103] STROUHAL M. a kol. *Bioelectrochemistry*, 2003, vol. 60, p. 29-36.
- [104] LADHAR-CHAABOUNI R. GARGOURI R., CHAFFAI A. H. *International Journal of Environment and Pollution*, 2007, vol 30, p. 593-605.
- [105] KŘÍŽKOVÁ S. a kol. *Czech Journal of Animal Science*, 2007, vol. 52, p. 143-148.
- [106] ADAM V. a kol. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2007, vol. 7, p. 2419-2429.
- [107] PRŮŠA R. a kol. *Clinical chemistry*, 2005, vol. 51, p. A56.
- [108] ADAM V. a kol. *Chemické listy*, 2008, vol. 102, p. 51-58.
- [109] ADAM V. a kol. *Electroanalysis*, 2005, vol. 17, p. 1649-1657.

Seznam zkratek

ACS	- voda splňující požadavky na čistotu Americké Chemické Společnosti
Cys	- L-cystein
DNA	- deoxyribonukleonová kyselina
GSH	- redukovaná forma glutathionu
GSH-Px	- glutathion peroxidáza
GSSG	- oxidovaná forma glutathionu
HMDE	- visící rtuťová kapková elektroda
MT	- metalothionein
NADPH	- redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
ROS	- reaktivní kyslíkové radikály
Se	- selen
SelP	- selenoprotein P
SelW	- selenoprotein W
SPS	- selenofosfát synteáza
T3	- trijodthyronin
T4	- tyroxin
tRNA	- transferová ribonukleonová kyselina
TRxR	- thioredoxin reduktáza