

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Transformace sloučenin selenu v systému půda-rostlina-
zvíře**

Bakalářská práce

**Monika Filipová
Ochrana krajiny a využívání přírodních zdrojů**

prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Transformace sloučenin selenu v systému půda-rostlina-zvíře" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracovávání bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Janě Najmanové a Ing. Lukášovi Prausovi, Ph.D. za pomoc při laboratorním zpracování. Dále bych ráda poděkovala Pavlu Vondráčkovi a Arnoštovi Kočímu za pomoc při suplementaci řasy a odebírání krve u pokusného zvířete.

Transformace sloučeniny selenu v systému půda-rostlina-zvíře

Souhrn

Bakalářská práce je zaměřena na stopový minerál selen, který je velmi důležitý pro zvíře i člověka a pro přirozené fungování organismu.

Teoretická část se zabývá výskytem selenu v půdách, v rostlinách, u zvířat, člověka a v České republice a v jiných zemích. Dávkování selenem u přežvýkavců je mezi 0,1 mg/kg až 0,3 mg/kg sušiny v krmivu. Při vyšším množství může selen působit toxicky a následkem toho je otrava nebo uhynutí zvířete. Člověk přijímá selen ze stravy, jako jsou obiloviny, mořské plody, maso, luštěniny a para ořechy. Denní dávka u dospělého člověka by měla být mezi 30 mg až 40 mg, ale u mužů a žen se dávkování selenem může lišit. Příjem selenu se odlišuje v každé zemi, kvůli různému geologickému rozložení. Je tedy rozdíl mezi nadbytkem a nedostatkem selenu. Vysoká koncentrace selenu se nachází v Severní Americe, a naopak nízká koncentrace se vyskytuje v Číně. V České republice je také nedostatek selenu v půdách oproti jiným zemím, ale zde nejsou tak závažná onemocnění.

Praktická část je zaměřena na domácí jalovici, které byl doplňován selen ve formě selenizované řasy každý den 10 g ráno a večer po dobu 10 týdnů. Z každého týdne byl odebrán vzorek krve, který se následně analyzoval technikou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Z porovnání hodnot prvního a posledního odběru vyplývá, že selen a další prvky se v krvi zvýšily. Nejvyšší nárůst byl u selenu, u kterého se to předpokládalo a dosahoval hodnot 200,6 $\mu\text{g/kg}$, kdy při prvním odběru byla hodnota v krvi 40,2 $\mu\text{g/kg}$.

Klíčová slova: selen, skot, krev, variabilita, *Chlorella vulgaris*

Transformation of selenium compounds in the soil-plant-animal system

Summary

Bachelor's thesis focuses on the trace mineral selenium, which is very important for animals and humans and for the natural functioning of the organism.

The theoretical part deals with the occurrence of selenium in soils, plants, animals, humans and in the Czech Republic and other countries. Selenium intake in ruminants is between 0.1 mg/kg to 0.3 mg/kg dry matter in feed. At higher levels, selenium can be toxic, resulting in poisoning or death of the animal. Humans ingest selenium from dietary sources such as cereals, seafood, meat, legumes and Brazil nuts. The daily dose for an adult should be between 30 mg and 40 mg, but the dosage of selenium can be different for men and women. Selenium intake varies from country to country, due to the different geological distributions. Thus, there is a difference between excess and deficiency of selenium. High concentrations of selenium are found in North America, and conversely, low concentrations are found in China. In the Czech Republic, there is also a deficiency of selenium in soils compared to other countries, but there are not as severe diseases.

The practical part focuses on a domestic heifer that was supplemented with selenium in the form of selenized algae every day 10 g morning and evening for 10 weeks. A blood sample was taken from each week and subsequently analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry technique. Comparison of the values of the first and last blood sampling showed that selenium and other elements increased in the blood. The highest increase was in selenium, which was expected and reached values of 200.6 µg/kg, when the first blood sampling was 40.2 µg/kg.

Keywords: selenium, cattle, blood, variability, *Chlorella vulgaris*

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce.....	8
2.1 Cíl práce	8
2.2 Hypotéza	8
3 Literární přehled.....	9
3.1 Selen.....	9
3.1.1 Selen v půdě.....	9
3.1.2 Selen v rostlinách.....	10
3.1.3 Selen u zvířat	10
3.1.4 Selen u člověka	12
3.1.5 Selen v ČR a v jiných zemích.....	14
3.2 Interakce Se s rizikovými prvky	15
3.3 Selenoproteiny	16
3.3.1 Glutathionperoxidáza (GPx).....	16
3.3.2 Selenoprotein P	17
3.3.3 Jodthyronin dejodináza.....	17
3.3.4 Selenoprotein W	18
3.3.5 Selenoprotein 15 kDa	18
3.4 Selenizovaná řasa / <i>Chlorella vulgaris</i>	18
4 Materiál a metody	20
4.1 Pokusné zvíře a krmná dávka.....	20
4.1.1 Doplněk do krmiva – selenizovaná řasa (<i>Chlorella vulgaris</i>).....	21
4.1.2 Odběr krve	21
4.2 Stanovení koncentrace Se (a dalších prvků) ve vzorcích složek krmné dávky, řasy a krve technikou ICP-MS	22
5 Výsledky.....	24
5.1 Obsah prvků v krmné dávce	24
5.2 Obsah prvků v <i>Chlorella vulgaris</i>	24
5.3 Obsah sledovaných prvků v krvi.....	25
6 Diskuze	27
7 Závěr	29
8 Literatura.....	30
9 Samostatné přílohy	31

1 Úvod

Selen se vyskytuje v prostředí v anorganických sloučeninách i organických sloučeninách. Plní důležitou fyziologickou funkci, kde existuje tenká hranice mezi pozitivními účinky a toxickými účinky, které můžou vést až k úmrtí.

Selen se vyskytuje v půdách, kde závisí na geologickém rozložení v různých zemích. Tenká hranice je i mezi nadbytkem a nedostatkem selenu v půdě, například Čína patří mezi země s nedostatkem selenu, kde se vyskytuje Keshanská nemoc a Kashin-Beckova choroba. Česká republika patří také mezi země s nízkým obsahem selenu v půdách, ale zde nejsou tak závažná onemocnění. Naopak ve Spojených státech je koncentrace selenu vysoká.

Rostliny selen přijímají v různém množství, biodostupnost Se závisí na srážkách, pH v půdě, aplikaci hnojiv a dalších faktorech. Selen u zvířat se podílí na antioxidační obraně, imunitě a metabolismu hormonů štítné žlázy. Doporučené dávkování selenem u zvířat je v rozmezí mezi 0,1 mg/kg až 0,3 mg/kg sušiny v krmivu. Selen u člověka je potřebný pro aktivitu několika důležitých bílkovin a podílí se na regulaci hormonů štítné žlázy. Denní dávka selenu pro člověka se doporučuje mezi 30 mg až 40 mg. Vhodným doplňkem stravy obsahující selen jsou ara ořechy, mořské plody a obiloviny.

2 Cíl práce a hypotéza

2.1 Cíl práce

Selen patří mezi významné esenciální prvky pro zvířata i člověka. Zároveň se ale tento prvek vyskytuje v prostředí v mnoha anorganických či organických sloučeninách a vazbách, které se liší svou biologickou aktivitou. Fyziologické rozmezí koncentrací selenu v potravě je velmi úzké, takže příliš nízké i příliš vysoké obsahy tohoto prvku mohou být pro člověka i zvířata škodlivé a v závažných případech až letální. Cílem této práce je popsat cestu selenu z půdy do potravních řetězců s důrazem na přeměnu organických a anorganických forem tohoto prvku.

2.2 Hypotéza

Transformace sloučenin Se v živočišném organismu závisí na formách tohoto prvku v dietě.

3 Literární přehled

3.1 Selen

Roku 1817 byl selen (Se) objeven švédským chemikem a lékařem Jonsnem Jakobem Berzeliiem (Kieliszek & Błażej, 2013). Pojmenoval ho „Selene“ podle řecké bohyně Měsíce. O sto čtyřicet let později Schwarz a Foltz označili selen za nezbytný pro zdraví zvířat, když zjistili, že jeho stopové množství chrání před nekrózou jater u krys s nedostatkem vitamínu E. Zájem o selen v lidském zdraví nabral na síle koncem šedesátých let 20. století a při zkoumání se hledala lidská onemocnění podobná poruchám zvířat reagující na Se (Brown & Arthur, 2001).

Selen je obecně považován za stopový minerál (El-Demerdash & Nasr, 2014). Je to polokov s atomovým číslem 34 (viz Obrázek 1) a je jedním z prvků, který má velký význam pro lidské zdraví a pro přirozené fungování organismu. Se má rovněž antioxidační vlastnosti a chrání organismus před působením volných radikálů a karcinogenních faktorů. Selen je prvek, který plní důležitou fyziologickou funkci, ale existuje tenká hranice mezi koncentrací, která má pozitivní účinky na organismus a koncentrací, při níž selen může začít působit toxicky (Kieliszek & Błażej, 2013). Selen se vyskytuje v životním prostředí, v různých koncentracích je rozšířen v zemské kůře a ve stopovém množství se nachází ve většině rostlinných a živočišných tkáních. Ačkoli není nezbytnou živinou pro rostliny, je nezbytnou živinou pro člověka a mnoho dalších forem života (Tsuji et al., 2011).

Obrázek 1: Selen v Periodické tabulce prvků

30.974 arsenic 33 As	34 Se 78.96	35.453 bromine 35 Br
74.922 antimony 51	52	iodine 53

Zdroj: Winkel et al., 2012

Zpočátku byl o tento prvek jen malý biologický zájem s výjimkou jeho toxických vlastností. Toxicita selenu byla poprvé rozpoznána a popsána u zvířat. U dobytka pasoucího se na některých rostlinách rostoucích v půdě s vysokým obsahem Se se objevilo zvláštní onemocnění zvané alkalická choroba nebo slepé vrávorání, která nakonec vedla k úhynu (viz dále). Předpokládalo se, že lidé žijící ve stejných oblastech mohou být také postiženi vyšším množstvím selenu, nicméně toxicita u lidí nebyla snadno rozpoznatelná (Watts, 1994).

3.1.1 Selen v půdě

V zemské kůře se selen vyskytuje v rozmezí 0,05-0,09 mg/kg, a to v pískovcích, v břidlicích, vápenatých zbytcích a ve fosforečných horninách (Poláková, 2010). Důvody

variability příjmu souvisejí nejen s obsahem selenu v půdě, na kterých se plodiny a krmiva pěstují, ale také na faktorech, které určují dostupnost selenu v potravním řetězci, včetně speciace selenu, pH půdy a obsahu organické hmoty a přítomnost iontů, které se mohou se selenem slučovat (Rayman, 2012). Selen v neutrálních a kyselých půdách můžeme nalézt ve formě seleničitanu, kde se železem vytváří těžce rozpustné komplexy (Poláková, 2010).

Je známo, že v zamokřené půdě je biologická dostupnost selenu nízká kvůli jeho tvorbě nerozpustných komplexů se železem, hliníkem, arzenem a těžkými kovy (Manley et al., 2006). V oblastech s ložisky uhlí a ropy je obsah rozpustného biologicky dostupného selenu (seleničitanů a selenanů) v půdě velmi nízký (Parshukova et al., 2014). Whanger (1989) po návštěvě zasažených oblastí přisuzoval vysoký příjem Se obyvatelstvem především používání uhlí s vysokým obsahem Se. Popílek ze spalování uhlí se také používal jako hnojivo, které výrazně zvyšovalo obsah Se v půdě, protože spalováním se Se jako další prvky zakoncentruje v popelu. Důsledkem pak byl zvýšený obsah Se v potravinách rostlinného původu pěstovaných na kontaminované půdě (Gupta & Gupta, 1998).

Toxicita selenu je obecně omezena na ty oblasti světa, např. v některých částech Číny, kde půdy s abnormálně vysokým obsahem Se produkují potravinářské plodiny obsahující vysoce toxické koncentrace Se. Půdy s vegetací obsahující více než 5 mg Se/kg jsou označovány jako selenonosné a jsou spojovány s otravami hospodářských zvířat a volně žijících živočichů (Gupta & Gupta, 1998).

3.1.2 Selen v rostlinách

Selen se nachází v půdě a rostliny ho přijímají v různém množství v závislosti na druhu rostlin, aplikaci hnojiv a srážkách (DPIRD, 2019). Rostliny absorbují selen z půdy ve formě seleničitanu a selenanu a syntetizují selenoaminokyseliny, přičemž selenomethionin (SeMet) představuje přibližně 50 % Se v zrnech obilovin; dalšími sloučeninami pak jsou Se-methylselenomethionin, selenocystein (SeCys) a Se-methyl-selenocystein (Skřivan et al., 2006), ty jsou ovšem jen minoritními složkami.

Některé rostliny rodu *Allium* (cibule, česnek) nebo *Brassica* (brokolice) přijímají více Se (tzv. Se-akumulátory) a tím tvoří minoritní složky ve vyšších množstvích (např. γ -glutamyl-Se-methyl-selenocystein). Podobně akumulují selen i para ořechy a luštěniny, tyto rostliny obsahují nejvíce selenu. Z hlediska nutričního jsou v jídelníčku vysoce zastoupeny i cereálie. Většina ovoce a zeleniny (kromě výše uvedených akumulátorů Se) obsahují jen zanedbatelné koncentrace selenu. Významným zdrojem selenu by mohly být některé druhy hub, které jsou akumulátory selenu a byl v nich nalezen selenomethionin (Kvíčala, 2018).

3.1.3 Selen u zvířat

Stopové minerály zinek (Zn), měď (Cu) a selen (Se) se podílejí na metabolismu vitaminů, syntéze bílkovin a imunitním systému zvířat. Doplnění stopových minerálů může ovlivnit zdraví, reprodukční stav a laktanční výkonnost u dojnic. Zinek hraje důležitou roli v syntéze DNA a RNA. Zvyšuje replikaci (proces zdvojení) DNA a proliferaci buněk

v katalytických, strukturálních a regulačních funkcích. Měď má fyziologické funkce spojené s buněčným dýcháním, růstem kostí, funkcí srdce, vývojem pojivové tkáně, procesy keratinizace a pigmentace. Selen se podílí především na antioxidační obraně, imunitě a metabolismu hormonů štítné žlázy. U savců je selen nezbytnou součástí nejméně 12 enzymů: 4 glutathion peroxidázy (GPx), které využívají glutathion k odbourávání hydroperoxidů; 3 jodthyronin 50-jodinasy, které katalyzují dejodinaci I-tyroxinu na biologicky aktivní hormon štítné žlázy 3,30-5-trijodthyroin; 3 thioredoxin reduktázy, které redukují oxidované bílkoviny; selenofosfát syntetasu 2, která se podílí na selenové aktivaci syntézy selenocysteinu; a methionin-R-sulfoxid reduktasu (Herdt & Hoff, 2011). Využití stopových prvků z organických zdrojů ve výživě zvířat, které jsou biologicky dostupnější ve srovnání s prvky z anorganických zdrojů, může být důležitým nástrojem pro maximalizaci produkce mléka a udržení zdraví (Cortinhas et al., 2012). Selen pomáhá předcházet zdravotním poruchám, jako je mastitida a kýla telat (DPIRD, 2019).

Nejvyšší koncentrace selenu u živočichů byla nalezena ve štítné žláze a v dalších endokrinně aktivních tkáních. Z hlediska lidské výživy je vysoká koncentrace selenu důležitá ve vnitřnostech (játra, ledviny) a svalech (Kvičala, 2018). Obsah selenu v krmných složkách pro zvířata závisí na koncentraci Se v půdě (Ševčíková, 2006). Přestože rostliny jsou důležitým zdrojem Se v lidské stravě, živočišné produkty se zdají být spolehlivějším zdrojem této základní živiny. Bylo zjištěno, že zvířata snadno zabudovávají přijatý Se do jedlých tkání, takže je možné produkovat maso obohacené o Se (Marounek, 2009).

Doporučení pro přísun Se přežvýkavcům se pohybují mezi 0,1 mg/kg až 0,3 mg/kg sušiny v krmivu. U přežvýkavců konzumujících krmiva s obsahem více než 5 mg Se/kg sušiny může dojít k selenóze. Proto, aby se předešlo k jakémukoli nadbytku ve výživě přežvýkavců, byla stanovena horní hranice obsahu Se v krmné dávce 0,5 mg Se/kg sušiny (Meyer et al., 2014). Selenóza se vyskytuje především u přežvýkavců nebo pasoucích se zvířat v důsledku konzumace rostlin s vysokým obsahem selenu, jako je například tzv. locoweed (několik druhů jedovatých rostlin z rodů *Astragalus* a *Oxytropis*, z čeledi *Fabaceae*); tyto druhy patří mezi tzv. hyperakumulátory, tedy rostlinné druhy schopné akumulovat extrémně vysoké obsahy Se v nadzemní biomase). U zvířat trpících selenózou byly zjištěny snížené hladiny vitamínu A a kyseliny askorbové (Watts, 1994). Vysoký obsah síry v potravě, olova, vojtěškového sena a vápníku v potravě snižuje absorpci selenu u přežvýkavců (Herdt & Hoff, 2011).

Toxikóza selenem se vyskytuje u hospodářských zvířat v selenonosných oblastech mnoha zemích. Tolerance hospodářských zvířat vůči příjmu vysokého obsahu selenu se liší podle formy, v jaké je selen přijímán, délky a kontinuity expozice, genotypu zvířat a interakcí mezi těmito faktory. Přesnou toleranci skotu a koní pasoucích se na selenonosných pastvinách je obtížné stanovit, protože příjem selenu z krmiv se vzhledem k chutnosti a dostupnosti značně liší. Byly zjištěny tři typy toxicity selenu u hospodářských zvířat: akutní toxikóza, slepé vrávorání a chronická alkalická choroba (Herdt & Hoff, 2011).

Jak už bylo zmíněno, chronická otrava Se nebo také alkalická nemoc vzniká, když zvířata konzumují přirozeně vyprodukovaná objemová krmiva a obiloviny obsahující selen v koncentracích dosahujících 4-5 mg Se/kg. Nejvýraznějšími příznaky chronické otravy Se jsou

atrofie srdce, atrofie a cirhóza jater. Otrava selenem u skotu, koní a prasat způsobuje praskání kopyt, kulhání, ztuhlost kloubů, vyhublost a vypadávání srsti. U prasnic se snižuje počet zabřeznutí a zvyšuje se počet uhynulých selat. U ptáků, kteří se živí dietou s obsahem Se, dochází k embryocidním deformacím.

Dále se u zvířat může objevit onemocnění „slepé vrávorání“, které se vyvíjí konzumací krmiv s vysokým obsahem selenu po dobu několika týdnů až měsíců. Příznaky zahrnují narážení do předmětů v cestě, zhoršení zraku, nechut', a následně dochází k úhynu v důsledku respiračního selhání (Gupta & Gupta, 1998). Dále se může vyskytnou následující klinické příznaky: u mladého skotu – špatná úživnost, nízká rychlost růstu, chronické průjmy a zadržování zimní srsti; svalová dystrofie u mladých a starších telat, slabost a neschopnost stát nebo chodit (DPIRD, 2019). Nedostatek selenu nebo vitamínu E může v určitých případech zvýšit patogenitu virů tím, že mění relativně neškodné viry na virulentní (Herdt & Hoff, 2011). Při nedostatku selenu lze doplňovat následně: na pastviny, dodávaný ve formě kapek, injekcí nebo nálevů, lizacími bloky a sypkými lizy a ve formě selenových granulí (DPIRD, 2019).

López-Alonso et al. (2016) provedli v severním Španělsku studii, ve které zjistili nedostatek minerálních látek, zejména jodu (I) a selenu v systémech ekologického chovu dojníc, který souvisí s nízkým obsahem těchto prvků v dietě. Ekologické mléko z této oblasti má nižší obsah minerálních látek ve srovnání s konvenčními mléčnými systémy. Je možné, že nízká hladina Se a I u skotu v ekologických chovech by mohla vést k nižší produkci v těchto chovech ve srovnání s konvenčními chovy založenými na pastvě ve stejné oblasti, to pak může vést k poruchám reprodukce a k dalším onemocněním. Je tedy vhodné hledat vhodnou alternativu k běžným minerálním doplňkům diety, která by odpovídala požadavkům ekologického zemědělství. Takovou alternativou mohou být například mořské řasy, které mají přirozeně vysoký obsah jak Se tak i I. Kromě vysokého obsahu minerálních látek jsou mořské řasy významným zdrojem antioxidantů a mají antimikrobiální a imunomodulační účinky, což by mohlo mít významný přínos pro produkci mléka. Doplnění mořských řas u skotu v ekologických systémech může vést ke zvýšení příjmu minerálních látek u krav, a tím ke zlepšení celkového stavu minerálních látek u krav (López-Alonso et al., 2016). V ekologickém zemědělství je proto výživa zvířat do značné míry závislá i na místních zeměpisných podmínkách a v některých oblastech může docházet k nedostatku minerálních látek v důsledku nízké dostupnosti některých stopových prvků. Například vzdálenost od moře je důležitým faktorem pro koncentraci jódu a v menší míře selenu. Mléčný skot potřebuje pro produkci mléka vysoké množství stopových prvků, a nedostatek těchto prvků je proto v ekologickém chovu mléčného skotu častější (Orjales et al., 2018).

3.1.4 Selen u člověka

Selen je esenciální živina potřebná pro aktivitu řady důležitých bílkovin. Konzumace Se v množství, které překračuje doporučenou výživovou dávku, může chránit před rakovinou prostaty a tlustého střeva. Doplnkový selen lze získat stravou, ale jeho biologická využitelnost závisí na zdroji. Proto dietní doporučení týkající se zlepšení příjmu Se závisí na charakterizaci biologické dostupnosti Se z potravinových zdrojů obsahujících Se (Finley, 2006). Jako doplňky lze používat anorganické a organické formy Se, jako je například selenan, seleničitan,

selenomethionin, kvasnice obohacené selenem nebo řasy obohacené selenem (Ševčíková et al., 2006). Za dobrý zdroj selenu jsou považovány obiloviny a zrna, dále mořské plody, ledviny, játra, maso a drůbež. Obsah se ale liší v závislosti na množství selenu přítomného v půdě a na způsobu přípravy. Selen je rozptýlen po celém těle, nejvyšší koncentrace se nacházejí v ledvinách a játrech (Watts, 1994).

Jak už bylo zmíněno, selen je účinným protinádorovým metabolitem, proto se někteří vědci domnívají, a omezené důkazy naznačují, že právě Se má velký vliv na snížení výskytu rakoviny tlustého střeva nebo štítné žlázy, jak už bylo zmíněno. Proto je též jedním z důvodů, proč se lidé snaží zvýšit příjem selenu (Finley, 2006).

Příjem selenu ve stravě se u lidí v jednotlivých zemích značně liší, je to způsobeno zejména nerovnoměrným geografickým rozložením Se v půdě (Marounek, 2009). Liší se od nedostatku Se až po toxické koncentrace, které mohou způsobit česnekový zápach z úst, vypadávání vlasů, lámání nehtů a špatný stav zubů (Rayman, 2012). Nedostatek selenu, způsobený extrémně nízkým příjmem ve stravě, má za následek závažné chorobné stavy u lidí, jako je např. Keshanova nemoc v Číně (viz dále) (Finley, 2006). Nízká hladina selenu je spojena se zvýšeným rizikem úmrtí, špatnou funkcí imunitního systému a zhoršením kognitivních funkcí (Rayman, 2012). Je-li tedy v těle u člověka málo selenu má to i dále dopad na poškození srdečních a svalových buněk, nervového systému, slinivky břišní, žaludku, střev, očí a vlasů. Zde dochází ke zvýšenému poškození buněk volnými radikály (Malečková, 2022). Výzkum Rotrucka a jeho kolegů zjistil, že nedostatek selenu vede k oxidačnímu poškození červených krvinek, které souvisí se sníženou aktivitou enzymu glutathionperoxidázy. Tento enzym snižoval účinky peroxidu vodíku na hemoglobin. Nedostatek selenu ve spojení s nízkým obsahem vitamínu E souvisí s vyšším výskytem rakoviny plic, kůže a trávicího traktu u lidí. Selen má také inhibiční účinek na chemické karcinogeny a urychluje jejich detoxikaci (Watts, 1994).

Biologická dostupnost selenu závisí na jeho konkrétní sloučenině a na celkovém složení potravin. Seleničitany, selenany, selenomethionin, selenocystein a sloučeniny selenu obsahující aminoskupiny vykazují nejlepší asimilaci (70-95 %), jejich biologické účinky a případná toxicita se však liší. Asimilaci selenu zvyšuje strava bohatá na nízkomolekulární bílkoviny a některé vitamíny (především vitamíny B, C a D). Selen se vyskytuje především vázaný s aminokyselinami: cysteinem (SelCys) a methioninem (SelMet). SelMet je pro lidský organismus nejvhodnější formou selenu, jako i seleničitan sodný, u obou byly prokázány zdravotní účinky, například při léčbě sepse (otravy krve) nebo autoimunitních onemocnění štítné žlázy. Pšenice a maso jsou dietní zdroje Se považované za nejdůležitější. Se bývá v těchto potravinách přítomen v relativně vysokých koncentracích a ve srovnání s anorganickými solemi Se je v těchto potravinách vysoce biologicky dostupný (Finley, 2006; Kieliszek & Błażej, 2013).

Světová zdravotnická organizace doporučuje pro dospělé denní dávku selenu 30 mg až 40 mg a také zdůrazňuje, že jednorázová dávka selenu 400 mg/d je neškodná. Malé odlišnosti mohou být mezi mužem a ženou, kdy u mužů je doporučená denní dávka 40-70 mg a u žen 45-55 mg. Dávky selenu, které jsou vyšší než 400-700 mg/d mohou působit toxické účinky. Ale

výzkumem, který provedli Reid et al. (2004), bylo zjištěno, že nepřetržitá dvanáctiměsíční suplementace selenem v dávce 1600 mg/d neměla žádné negativní účinky na zdraví pacientů. A však u pacientů, kteří dostávali 3200 mg/d, byly již pozorovány zjizvitelné známky toxicity selenu (Kieliszek & Błażej, 2013).

3.1.5 Selen v ČR a v jiných zemích

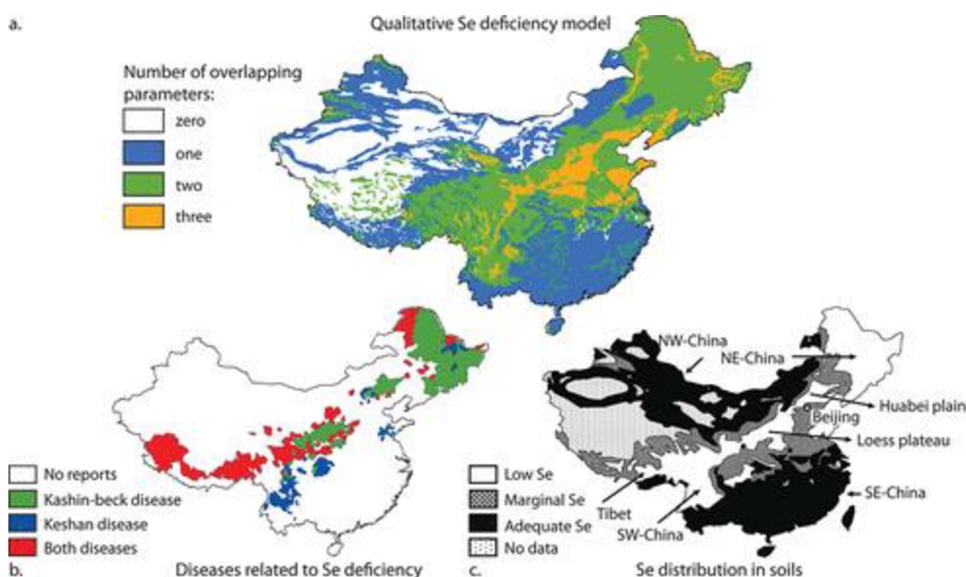
Jedním z nejnižších příjmů selenu v rámci Evropy je postižena Česká republika. Obyvatelé přijímají asi 30 % Se z rostlin. Nedostatkem selenu jsou nejvíce ohroženy těhotné a kojící ženy spolu s novorozenaty (vysoká spotřeba Se pro vývoj a růst), a senioři. V Jižních Čechách se u seniorů několika metodami určil příjem selenu u této skupiny obyvatel mezi 15 a 35 µg Se/den. Příjem nízkého selenu odpovídala i nízká průměrná koncentrace Se v séru podle místa odběru – mezi 45 a 60 µg/l. Stejně výsledky se potvrdily i u seniorů z Prahy a Teplic (Kvíčala, 2018).

Příjem selenu je vysoký ve Venezuele, Kanadě, USA a Japonsku. Naopak v Evropě, zejména ve východní Evropě je příjem selenu nižší. V Číně jsou oblasti s nedostatkem i nadbytkem selenu. Na Novém Zélandu, kde byl dříve příjem selenu nízký, se příjem zvýšil po dovozu australské pšenice s vysokým obsahem selenu (Rayman, 2012).

Vysoká koncentrace Se v půdě se nachází ve střední části Spojených států a Kanady. Plodiny na těchto půdách jsou obohaceny o větší dávku Se (Finley, 2006). Půdy v Severní Americe jsou také bohaté na selen, protože v západní části severoamerického kontinentu se nacházejí Velké pláně, které byly vytvořeny mohutnými mořskými a kontinentálními sedimenty. Hudak (2009) zjistil, že v severozápadním Texasu překračují koncentrace selenu v pitné vodě nejvyšší přípustnou koncentraci o 4 % a v závlahové vodě o 19 %. A v severoamerické pšenici je obsah selenu desetkrát vyšší než v pšenici ve Velké Británii. (Parshukova et al., 2014)

V oblasti Keshan v Číně je v půdě selenu nedostatek, tím pádem i v potravinách rostlinného původu. Zde se kvůli nedostatku selenu vyskytuje Keshanská nemoc, která se projevuje poškozením srdce, především u dětí a mladých žen (Malečková, 2022; Watts, 1994). Dále se zde vyskytuje kvůli nízkému výskytu Se v půdě Kashin-Beckova choroba, která je charakterizována deformací postižené kloubní chrupavky (porucha kostí a kloubů). Tato choroba představuje vážnou hrozbu pro kvalitu života z důvodu omezené pohyblivosti, bolestem a nepohodlí. S těmito následky choroba zkracuje délku života. Postihuje hlavně děti v období vývoje. V Číně a v sousedních částech Ruska a v Severní Koreji postihuje choroba nejméně 2,5 milionu lidí (Lv et al., 2014; Watts, 1994). Zastoupení obou nemocí v Číně je znázorněno na Obrázku 2.

Obrázek 2: Kvalitativní model nedostatku Se v Číně



Zdroj: Winkel et al., 2012

Obrázek 1: Srovnání vybraných map Číny (kromě Tchaj-wan). (a) Kvalitativní mapa rizika nedostatku Se. Barvy označují, zda jsou přítomny rizikové faktory 0 (bílá), 1 (modrá), 2 (zelená) nebo 3 (žlutá). Těmito rizikovými prvky jsou (i) poměr evapotranspirace a srážek mezi 1,0 a 2,5, (ii) pH půdy mezi 5,5 a 7,2 a (iii) obsah organického uhlíku v půdě vyšší než 0,6 %, což jsou obě vlastnosti půdy, které omezují příjem Se rostlinami. (b) Výskyt Keshanské a Kashin-Beckovi nemoci, které byly spojeny s nedostatkem Se. (c) Distribuce Se v půdě (Winkel et al., 2012).

Některé oblasti severoevropského Ruska (obzvláště republika Komi) jsou známé svými ložisky ropy a uhlí. Průmysl, těžba přírodních zdrojů a urbanizace způsobují znečištění půdy těžkými kovy. Z těchto důvodů lze předpokládat, že na území, na kterém provedli svou studii Parshukova et al. (2014), může nedostatek selenu zhoršovat využití mikroprvků. Cílem této studie bylo provést průzkum hladiny Se u obyvatel severoevropského Ruska, zjistit sezónní účinky suplementace selenem a určit vzájemné vztahy mezi hladinou selenu a hormonů štítné žlázy (Parshukova et al., 2014). Také Combs et al. (2009) ukázal, že významné sezónní účinky dlouhodobé suplementace selenem ovlivňují koncentrace hormonů štítné žlázy v krevní plazmě, především u žen s určitou dietou

3.2 Interakce Se s rizikovými prvky

Antagonistické účinky selenu a stříbra (Ag), arsenu (As), kadmia (Cd), rtuti (Hg) a thalia (Tl) popsal Ganther (1974). Selen sice chrání tkáň před toxickými účinky těžkých kovů, ale vylučování toxických těžkých kovů se léčbou selenem nezvyšuje. Selen váže tyto kovy, jako je rtuť a kadmium, a tím je činí méně škodlivými pro buňky a tkáň. Bylo prokázáno, že fluor (F) působí proti účinkům selenózy (Watts, 1994).

3.3 Selenoproteiny

Selen je základní mikroživina s velkým metabolickým významem (Brown & Arthur, 2001). Je součástí několika důležitých selenoproteinů a enzymů, které jsou nezbytné pro životní funkce, jako je antioxidační ochrana, tlumení zánětů, katalyzátor produkce aktivního hormonu štítné žlázy, syntéza DNA, plodnost a reprodukce (Ševčíková et al., 2006; Skřivan, 2008). Selen je nutný pro katalytickou aktivitu selenoproteinů a mnoho příznaků a symptomů nedostatku selenu může souviset se sníženou aktivitou selenoproteinů (Finley, 2006).

Selen je přítomen v 25 identifikovaných selenoproteinech (aktivním centrem je selenocystein (Rayman, 2012)), které se běžně vyskytují v lidském organismu, a ve 12 selenoproteinech v kvasinkových buňkách. Selenoproteiny hrají důležitou roli na buněčné úrovni v mnoha metabolických procesech. Největší biologický význam selenu v organismu je spojen s jeho výskytem v aktivních místech mnoha enzymů a proteinů (Kieliszek & Błażej, 2013). Za fyziologických podmínek je Se v selenocysteinu téměř plně ionizován, a proto je mimořádně účinným biologickým katalyzátorem (Brown & Arthur, 2001).

První selenoproteiny byly objeveny v roce 1973. Jednalo se o glycinreduktázu přítomnou v buňkách bakterie *Clostridium sticklandii* a formát dehydrogenázu přítomnou v buňkách bakterie *Clostridium thermoaceticum* (Kieliszek & Błażej, 2013).

3.3.1 Glutathionperoxidáza (GPx)

Flohe et al. (1973) izolovali glutathionperoxidázu, kdy se jednalo o první popsany a do současnosti nejlépe zvládnutý selenoenzym, který je stále považován za jeden z klíčových enzymů indukujících degradaci peroxidu vodíku. GPx plní hlavní ochrannou funkci proti oxidaci lipidů buněčné membrány a je součástí systému, který likviduje volné radikály. Pět různých lidských enzymů GPx tvoří skupinu enzymů, které mají schopnost redukovat anorganické (H_2O_2) a organické (ROOH) peroxidy za vzniku kyseliny selenové jako meziprojektu (Kieliszek & Błażej, 2013). Může také fungovat jako zásobárna Se, která obsahuje 4 selenocysteinové zbytky v tetramerní struktuře (Brown & Arthur, 2001).

Gastrointestinální glutathionperoxidáza (GPx2)

Gastrointestinální glutathionperoxidáza chrání savce před toxicitou použitých lipidových hydroperoxidů. Ve studiích na zvířatech snižuje nedostatek Se aktivitu enzymu. Gastrointestinální glutathionperoxidáza je nejdůležitějším selenoproteinovým antioxidantem v tlustém střevě. Oxidační stres je kritickou událostí v procesu vzniku nádorového onemocnění. Dá se tedy předpokládat, že antioxidační funkce GPx2 bude poskytovat včasnou obranu proti rakovině tlustého střeva (Brown & Arthur, 2001). Z hlediska sekvence se nejvíce podobá klasické GPx a pravděpodobně vykazuje podobnou substrátovou specifitu s preferencí organických hydroperoxidů jako je hydroperoxid kyseliny linolové. Poprvé byl zjištěn ve střevním epitelu potkanů. U lidí se vyskytuje v játrech (Florian et al., 2001).

Extracelulární glutathionperoxidáza (GSHPx, GPx3)

Extracelulární GPx3 je selenoprotein s antioxidačním potenciálem, ale to nemusí být jeho hlavní funkce v plazmě. GPx3 může mít specifickou antioxidační funkci v ledvinných tubulech nebo v extracelulárních prostorech (Brown & Arthur, 2001).

Fosfolipid hydroperoxidová glutathionperoxidáza (PHGPX, GPx4)

Fosfolipid hydroperoxidová glutathionperoxidáza je druhým intracelulárním selenoenzymem objevený u savců. Původně byla považována za protein inhibující peroxidaci a později byla identifikována jako Se-dependetní glutathionperoxidáza (Lei et al., 1995). PHGPX byla identifikována membránově asociovaná, která je přímo zodpovědná za redukční destrukci lipidových hydroperoxidů. Tento enzym je monomer a jeho aktivita je zachována přednostně před GPx při nízkém přívodu Se v potravě (Brown & Arthur, 2001). Aktivita PHGPX je ve většině tkání přibližně desetinová oproti GPx (Lei et al., 1995).

GPx4 se nachází ve spermatidách jako rozpustná peroxidáza, ale ve zralých spermích přetrvává jako enzymaticky neaktivní, oxidativně zesíťovaný nerozpustný protein. Spermie obsahují nejvyšší koncentrace selenu ze všech savčích tkání, přičemž jeho potřeba se zvyšuje na počátku spermatogeneze. Nejméně 50 % materiálu kapsidy, která podpírá šroubovici mitochondrií, tvoří GPx4. Nedostatečný přísun Se narušuje syntézu mitochondriálních kapsid spermií, což ovlivňuje pohyblivost spermií a může vyvolat sterilitu (Brown & Arthur, 2001).

Thioredoxin reductáza (TR)

Thioredoxin je proteinový disulfid důležitý pro antioxidační obranu a regulaci buněčného růstu. Thioredoxin reductáza je enzym obsahující selenocystein, který katalyzuje redukci thioredoxinu závislou na NADPH, a hraje tak regulační roli v jeho metabolické aktivitě. Jelikož thioredoxin stimuluje proliferaci normálních i nádorových buněk a v nádorových buňkách je přítomen ve vysokých koncentracích, může hrát zvýšená aktivita TR důležitou roli v prevenci některých forem rakoviny (Brown & Arthur, 2001).

3.3.2 Selenoprotein P

Selenoprotein P představuje 60 % selenu v plazmě (Herdt & Hoff, 2011), který obsahuje 10 atomů Se v molekule ve formě selenocysteinu. Extracelulární GSHPx a selenoprotein P tvoří více než 90 % plazmatického selenu a oba mohou sloužit jako transportní proteiny pro Se. Selenoprotein P je však také exprimován v mnoha tkáních a je spojen s buněčnými membránami (např. v játrech), což naznačuje, že ačkoli může usnadňovat distribuci Se v celém těle, nemusí to být jeho jediná funkce a může sloužit jako antioxidant (Brown & Arthur, 2001).

3.3.3 Jodthyronin dejodináza

Druhou významnou třídou selenoproteinů jsou enzymy jodthyronin dejodinázy, které katalyzují 5-5-mono-dijodinaci prohormonu tyroxinu (T4) na aktivní hormon štítné žlázy 3-30-5-trijodthyronin (T3) a přeměnu neaktivního reverzního T3 na 3-30-dijodthyronin. Hormony

štítné žlázy hrají regulační roli v expresi jaterních enzymů a funkci neutrofilů. Proto ve studiích s doplňováním Se na zvířatech nedostatek vztahu mezi účinkem na enzymy metabolizující léčiva a metabolismus glutathionu v játrech, funkcí neutrofilů a změnami aktivity GSHPx podnítl zkoumání vztahu mezi Se a stavem štítné žlázy. Plná aktivita hormonů štítné žlázy závisí na dejodinaci tyroxinu na trijodthronin (T3). Většina T3 vzniká periferní dejodinací T4 katalyzovanou selenoenzymem typu 1 jodtyronin 50 dejodinázou. Existují tři typy enzymů jodtyronin dejodinázy závislých na Se, které fungují ve specifických tkáních, jako jsou játra a mozek, a udržují homeostázu plazmatických a orgánových hormonů štítné žlázy (Brown & Arthur, 2001).

3.3.4 Selenoprotein W

Ve studiích na zvířatech ovlivňuje příjem Se tkáňové koncentrace selenoproteinu W, který je nezbytný pro svalový metabolismus. Suplementace Se zabraňuje kalcifikace kosterního svalstva ovcí a skotu, známé jako onemocnění bílých svalů (Brown & Arthur, 2001; Herdt & Hoff, 2011). Význam selenoproteinu W pro metabolismus lidského kosterního svalstva není zcela objasněn, ale bylo zjištěno, že klonování jeho cDNA posílí výzkum lidských svalových onemocnění, jako je svalové dystrofie, u které byla prokázána reakce na suplementaci Se. U mentální anorexie byla zaznamenána myopatie způsobená nedostatkem selenu, popisovaná jako nemoc bílých svalů (Brown & Arthur, 2001).

3.3.5 Selenoprotein 15 kDa

Z mnoha selenoproteinů je selenoprotein o velikosti 15 kDa exprimován ve vysokém množství v játrech, prostatě, ledvinách, varlatech a mozku. Dále je ve velmi vysokých hladinách exprimován v buňkách rakoviny tlustého střeva (Canter et al., 2021).

3.4 Selenizovaná řasa / *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris je jednobuněčná mikrořasa, která patří mezi zelené mikrořasy, a které poprvé identifikoval Beijerinck v letech 1890-1893. V roce 1894 založil německý vědec Kruger čistou kulturu *Chlorella* spp. (Ahmad et al., 2020).

Řasa roste za autotrofních, heterotrofních i mixotrofních růstových podmínek. Mikrořasy jsou mikroskopické eukaryotické organismy schopné uvolňovat kyslík fotosyntézou a vytvářet biomasu pro krmivo, užitečné sloučeniny a palivo. Hromadí biomasu prostřednictvím fotosyntetického procesu využívajícího sluneční světlo, vodu a oxid uhličitý. Kompletní cyklus vývoje mikrořas trvá od 24 h do několika dnů a během jejich extrémního růstu se může každých několik hodin zdvojnásobit. V poslední době se průmysl mikrořas nachází ve fázi rychlého rozvoje, přičemž na prvním místě v prodejnosti jsou nutraceutika následovaná aplikacemi v potravinářství a krmivářství. *Chlorella* spp. je nejrozšířenější zelenou mikrořasou, protože ji mnozí využívají jako zdravou potravinu, pro krmiva hospodářský zvířat, v akvakultuře a také v léčivém a kosmetickém průmyslu (Ahmad et al., 2020).

Sladkovodní řasa *Chlorella* spp. je známá svými pozitivními účinky na zdraví. Proto ji lze považovat za vhodný nosič organicky vázaného selenu. Podle Alcantara a Lopes (1998) představuje selenomethionin hlavní část analogů selenoaminokyselin v buňce řasy (Svoboda et al., 2009). *Chlorella* spp obsahuje dvojnásobné množství bílkovin (60 %) ve srovnání se všemi druhy luštěnin, 20 % polysacharidů a 10 % tuků, stopové prvky a vitaminy (B komplex, thiamin, C, D, E, a K). Neprodukuje žádné toxické metabolity a její biomasa obsahuje mnoho biologicky aktivních látek (Ševčíková et al., 2006). V současné době je Japonsko světovou jedničkou v konzumaci *Chlorelly* a využívá ji k léčbě, protože se ukázalo, že má imunomodulační a protirakovinné vlastnosti (Safi et al., 2014).

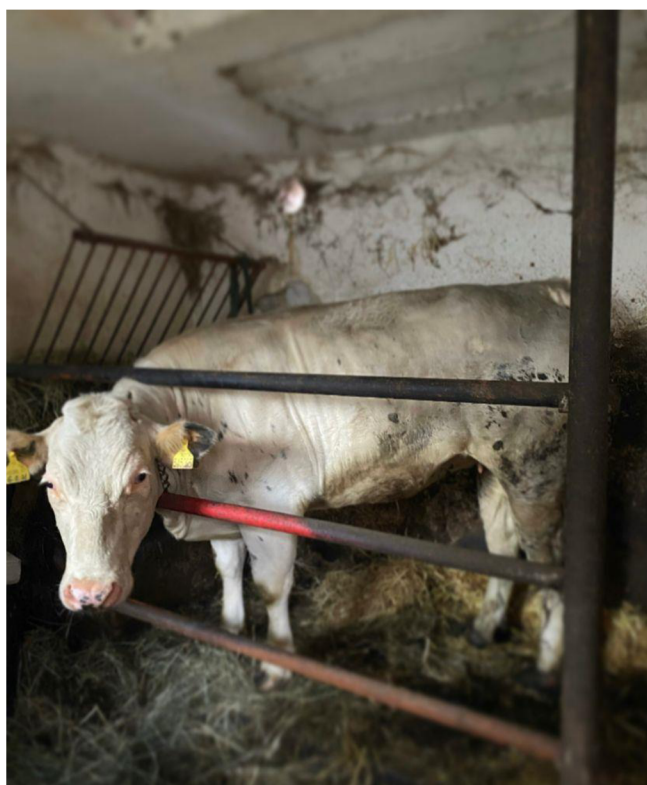
4 Materiál a metody

4.1 Pokusné zvíře a krmná dávka

Praktická část je zaměřena na vybranou jalovici z domácího chovu, která byla krmena přídatkem selenizované řasy po dobu 10 týdnů a odebírán reprezentativní vzorek krve jednou za týden, ve kterém byl stanoven obsah Se a dalších prvků. Byly odebrány i jednotlivé komponenty krmné dávky, ve kterých byl rovněž stanoven obsah Se a dalších prvků.

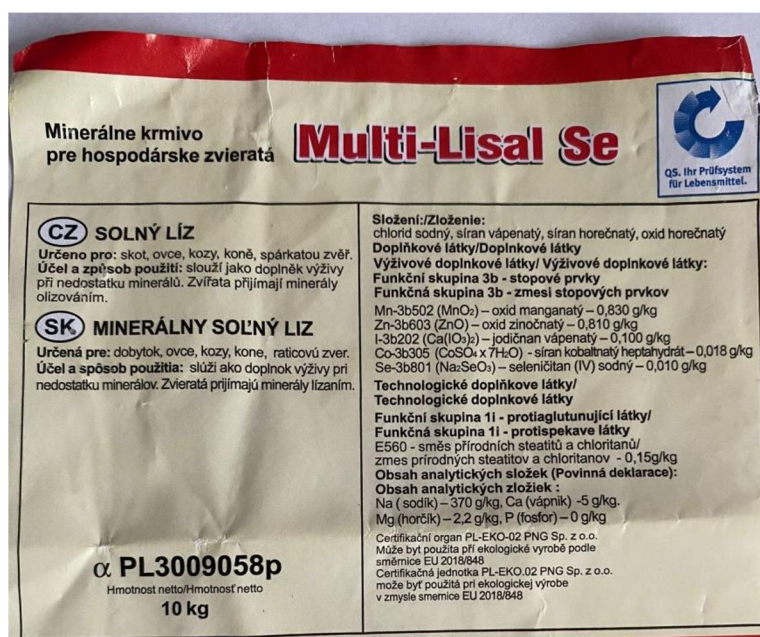
Jalovice z domácího chovu je zkřížené plemenu Holštýn × Belgické modré, narozena 16. 8. 2021, viz Obrázek 3. Krmena je každý den 2× denně, ráno a večer. Krmivo pro jalovici obsahuje seno, z vlastního pozemku, senáž (travní a jetelová) a solný liz. Ze všech složek krmné dávky se odebral reprezentativní vzorek, kde se zjišťoval obsah selenu a dalších prvků. Vzorky byly vysušeny při laboratorní teplotě a jemně rozemlety pomocí laboratorního mlýnku. U solného lizu je obsah selenu deklarován, viz Obrázek 4.

Obrázek 3: Jalovice



Zdroj: Vlastní foto

Obrázek 4: Obsah solného lizu



Zdroj: Vlastní foto

4.1.1 Doplněk do krmiva – selenizovaná řasa (*Chlorella vulgaris*)

Do krmiva se přidávala selenizovaná (zelená) řasa vždy 10 g ráno a 10 g večer po dobu 10 týdnů. Množství přidavku selenu se určilo podle jeho zastoupení v krmné dávce. Podle Tabulky 1 a 2, se dá předpokládat, že s přidavkem selenizované řasy se selen a další prvky, budou v krvi jalovice zvyšovat.

Chlorella spp. byla vyrobena v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd ČR v Třeboňi. Kultivace probíhala heterotopicky ve fermentorech na živném médiu obsahující glukosu a seleničité soli. Sprejově sušená biomasa rozpadlých řasových buněk, se vyznačuje vysokým obsahem Se stanoveným pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Svoboda et al., 2009).

4.1.2 Odběr krve

Každý týden se odebíral jeden vzorek krve, pravidelně vždy v pondělí v poledne a to od 12. 9. 2022 do 21. 11. 2022. Celkem se odebralo 11 vzorků krve, kdy první vzorek krve byl odebrán ještě před přidáváním selenizované řasy.

Vzorky se odebíraly z ocasní žíly (*vena caudalis mediana*) plastovou zkumavkou HEMOS s integrovanou jehlou. Po odebrání vzorku krve ze zkumavky byla krev převedena do zkumavky s heparinem, kde se krev nesráží, a byla uložena do mrazáku ve svislé poloze v držáku na zkumavky. Tento postup se vždy opakoval.

Odebrané zmrazené vzorky krve, byly převezeny v termopřevrácce na FAPPZ, kde následně proběhlo stanovení koncentrace selenu a dalších prvků ve vzorcích krve.

4.2 Stanovení koncentrace Se (a dalších prvků) ve vzorcích složek krmné dávky, řasy a krve technikou ICP-MS

Vzorky krve byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v heparinizovaných zkumavkách. Poté byly rozmrazeny v lednici při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alikvotní podíl vzorku krve ($250\text{--}300\text{ }\mu\text{l}$) byl pipetován do čisté 15 ml plastové zkumavky. Hmotnost pipetovaného vzorku byla zaznamenána s přesností na 0,1 mg. Vzorky krve byly naředěny ředícím roztokem $50\times$ podle metodiky popsané v Batista et al. (2009). Ředící roztok byl připraven z ultračisté vody ($\geq 18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$; Milli-Q systém; Millipore, SAS, Francie) obsahující 0,01 % (V/V) Tritonu X-100 (extra čistý, Carl Roth, Německo) a 0,1 % (m/V) HNO_3 (Analpure, Analytika, ČR), koncentrace HNO_3 byla oproti původní metodice snížena.

Vzorky jednotlivých komponentů krmné dávky a řasy byly rozloženy metodou mokrého rozkladu za pomoci mikrovlnného ohřevu následovně: 0,4 g suché homogenizované biomady bylo naváženo do reakčních teflonových nádob. Vzorky byly poté zality 8 ml 65 % kyseliny dusičné a 2 ml 30 % peroxidu vodíku. Takto připravené vzorky byly v teflonových nádobách rozloženy v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem v zařízení Ethos 1 (MLS GmbH, Německo) po dobu 45 minut. Po vychladnutí nádob byly vzorky převedeny do 20 ml zkumavek, doplněny po rysku demineralizovanou vodou a uchovány při laboratorní teplotě do doby měření.

Takto upravené vzorky se analyzovaly technikou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS; Agilent 7700x, Agilent Inc., USA), který byl prováděn v Laboratoři environmentální chemie FAPPZ, viz Obrázek 5.

Obrázek 5: ICP-MS; Agilent 7700x, Agilent Inc., USA



Zdroj: Vlastní foto

Vzorky se do argonového plazmatu zavádějí ve formě jemného aerosolu. Plazma aerosol vysuší, disociuje molekuly a poté odebere atomům elektron, čímž se vytvoří samostatně nabitě ionty, které jsou nasměrovány do hmotnostního filtru. Přístroj ICP-MS používá

kvadrupólový hmotnostní spektrometr, který rychle skenuje zvolené rozsah hmotností, přesněji poměry hmotnosti a náboje m/z . V každém okamžiku prochází hmotnostním spektrometrem od vstupu k výstupu pouze takový typ částic, který splňuje daný parametr m/z . Po výstupu z hmotnostního filtru dopadají ionty na první dynodu elektronového násobiče, který slouží jako detektor. Nárazem iontů se uvolní kaskáda elektronů, které se zesilují, až se z nich stane měřitelný impuls. Software porovnává intenzity naměřených pulzů s intenzitami ze standardů, které tvoří kalibrační křivku, a určuje koncentraci prvku. Pro každý měřený prvek je obvykle nutné měřit pouze jeden izotop, protože poměr izotopů je v přírodě pevně daný (PerkinElmer, Technical Note).

Vlastní měření (Se, Mn, Fe, Co, Cu, Zn) probíhalo v tzv. heliovém módu, který snižuje úroveň spektrálních polyatomických interferencí, např. $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, které způsobují falešně pozitivní signál při měření s využitím izotopu ^{78}Se . Přístroj byl kalibrován metodou externí kalibrace s využitím víceprvkových roztoků analytů v rozmezí koncentrací 0,1-1000 mg/l (ASTASOL-MIX, Analytika, ČR) v 0,01 % (V/V) Tritonu X-100 a 0,1 % (m/V) HNO_3 , tedy v ředícím roztoku. Pro korekci vlivu matrice a driftu signálu analytů v čase byla použita metoda interního standardu s využitím víceprvkového roztoku obsahujícího 100 $\mu\text{g/l}$ Ge, Rh, In a Lu (ASTASOL-MIX, Analytika, ČR), který byl nepřetržitě přiváděn do zmlžovače spolu se vzorky. Výsledky byly zpracovány v softwaru MassHunter (Agilent, USA) a dále přeneseny do grafů, viz Graf 1. Pro převod z objemových jednotek na jednotky hmotnostní byla použita specifická hmotnost krve 1,059 g/ml.

5 Výsledky

5.1 Obsah prvků v krmné dávce

Tabulka 1: Obsah prvků v krmné dávce pro jalovici (výsledky jsou prezentované jako průměr ± směrodatná odchylka) [mg/kg]

	Mn mg/kg	Fe mg/kg	Co mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Se mg/kg
seno	107 ± 1	134 ± 47	0.094 ± 0.024	6.23 ± 0.5	22.5 ± 5.4	0.044 ± 0.00
senáž jetelotravní	55.2 ± 9	467 ± 51	0.267 ± 0.009	9.72 ± 0.4	26.7 ± 1.4	0.042 ± 0.01
senáž travní	62.6 ± 3	447 ± 19	0.269 ± 0.016	7.49 ± 0.0	24.5 ± 2.3	0.030 ± 0.01
solný liz*	830	-	18	-	810	10

*ten jsme neanalyzovali, uvádíme deklarované hodnoty

V tabulce je zřejmé, že největší koncentrace selenu je u solného lizu 10 mg/kg, kde je vysoký i mangan 830 mg/kg a zinek 810 mg/kg. Nižší hodnota oproti železu a manganu je u kobaltu 18 mg/kg. U sena je největší podíl železa 134 mg/kg a manganu 107 mg/kg, a naopak nejmenší zastoupení má selen 0,044 mg/kg. Jetelotravní senáž má koncentraci nejvyšší u železa 467 mg/kg, manganu 55,2 mg/kg a zinku 26,7 mg/kg, a naopak nejnižší u kobaltu 0,267 mg/kg a selenu 0,042 mg/kg. V travní senáži je nejvyšší hodnota u železa 447 mg/kg. Nízké zastoupení má kobalt 0,269 mg/kg a selen 0,030 mg/kg.

5.2 Obsah prvků v *Chlorella vulgaris*

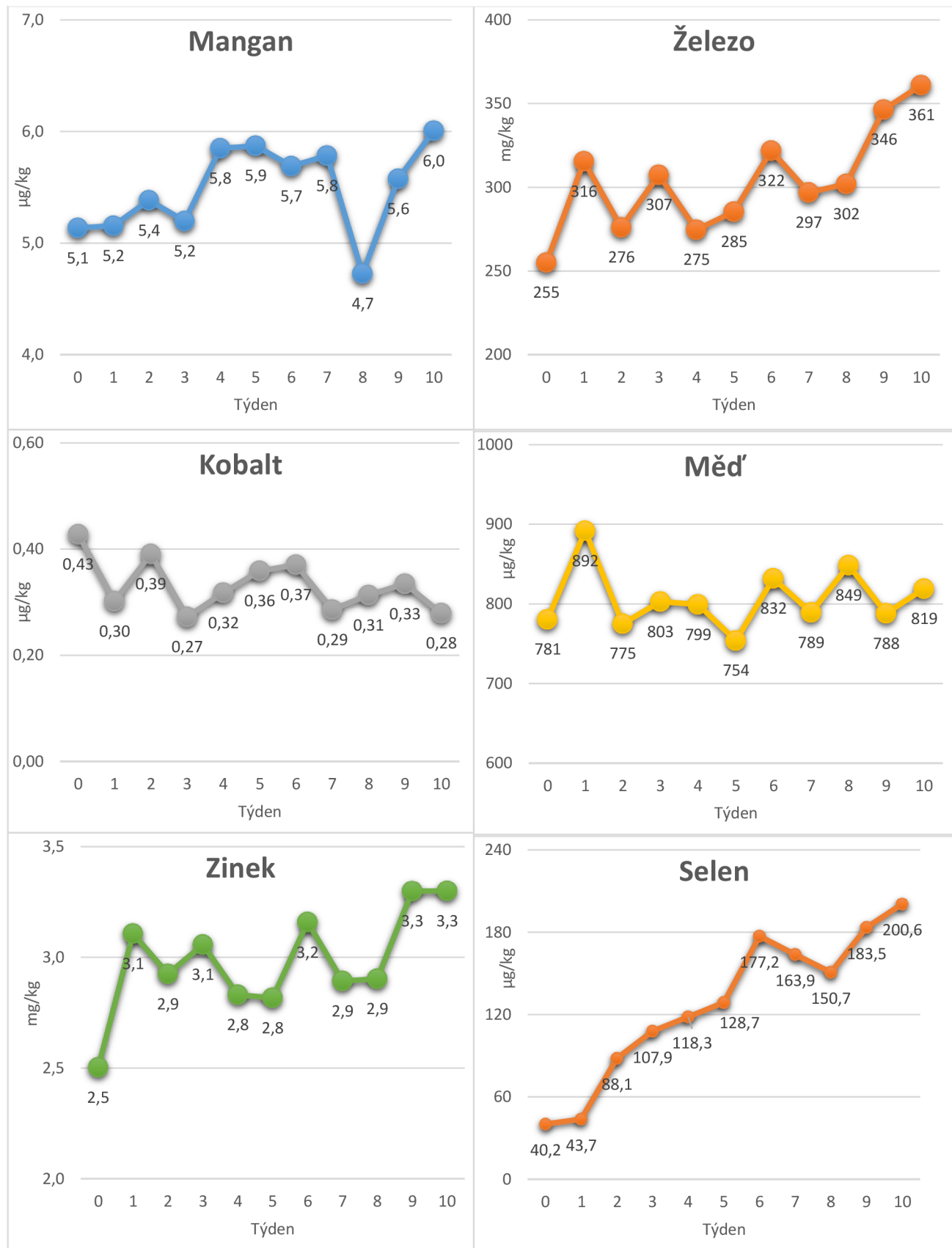
Tabulka 2: Obsah prvků ve sladkovodní zelené řase *Chlorella vulgaris* (výsledky jsou prezentované jako průměr ± směrodatná odchylka) [mg/kg]

	Mn mg/kg	Fe mg/kg	Co mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Se mg/kg
řasa	146 ± 1	998 ± 8	27.3 ± 0.184	51.2 ± 0.8	131 ± 3.6	161 ± 3.19

Obsah prvků ve sladkovodní zelené řase *Chlorella vulgaris* byly stanoveny na katedře agroenvironmentální chemie a výživy rostlin FAPPZ. Z této tabulky je znatelné, že největší zastoupení má železo 998 mg/kg. Následuje mangan 146 mg/kg a selen 161 mg/kg, a nejnižší koncentrace je u mědi 51,2 mg/kg a kobaltu 27,3 mg/kg. Je zřejmé, že řasa může být nutričním zdrojem i dalších sledovaných prvků, jejichž obsahy významně přesáhly obsahy v objemovém krmivu.

5.3 Obsah sledovaných prvků v krvi

Graf 1: Obsah sledovaných prvků v krvi pokusné jalovice



Z grafů je zřetelně vidět, že prvky v krvi jalovice mají většinou rostoucí trend. Mangan v krvi má hodnoty od 4,7 až 6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U 8. vzorku krve je viditelné že hodnota klesla průměrně o 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U železa je vidět rostoucí trend s hodnotami od 255 až 361 mg/kg , kdy nejnižší hodnota je u 0. odběru krve, kdy selenizovaná řasa ještě nebyla přidávána do krmiva. V dalších odběrech je viditelné, že s vysokou hodnotou železa u zelené řasy roste i železo v krvi jalovice. Kobalt má převážně klesající trend s hodnotami od 0,43 po 0,27 mg/kg , kde nejnižší hodnota je u 3. odběru. V selenizované řase je kobalt nízký, tudíž se tolik v krvi nezvyšuje. U mědi je trend stagnující s hodnotami od 754 až 892 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Měď v selenizované řase má vyšší hodnotu než kobalt, ale stejně jako u kobaltu ani zde není vidět zřetelný nárůst, i když hodnoty má měď vyšší. Zinek má viditelně rostoucí trend s hodnotami od 2,5 až 3,3 mg/kg . V selenizované řase má zinek hodnotu 131 mg/kg , který je 5x vyšší než v krmivu. Tudíž rostoucí trend se zde předpokládá. Podobně je to i u selenu, kde je zřetelně vidět rostoucí trend s hodnotami od 40,2 po 200,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, zde je i největší nárůst ze všech prvků. V selenizované řase má selen hodnotu 161 mg/kg , což je 4 000x vyšší než u krmiva jalovice.

6 Diskuze

Z našich výsledků vyplývá, že obsah selenu a dalších prvků v krmné dávce je nízký a při přidavku selenizované řasy se obsah selenu v krvi radikálně zvýšil, stejně tak i mangan, železo a zinek. Po ukončení pokusu a bez přidavku selenizované řasy do krmiva, se dá předpokládat, že hodnoty selenu a dalších prvků v krvi jalovice budou klesat.

Watts (1994) uvádí, že zpočátku o selen nebyl velký zájem s výjimkou jeho toxických vlastností. Kdy toxicita selenu byla poprvé rozpoznána a popsána u pasoucího se dobytka na půdě s vysokým obsahem Se, a kde se také objevila alkalická nemoc, která vedla k úhynu zvířat. U lidí ve stejné oblasti nebyla toxicita selenem rozpoznatelná. Gupta a Gupta (1998) k alkalické nemoci doplňují, že vzniká konzumací přirozeně vyprodukovaných objemových krmiv a obilovin obsahující Se, které dosahují koncentraci 4-5 mg Se/kg.

Kabata-Pendias (2011) poukazuje na to, že sezónní rozdíly v koncentraci stopových prvků v píce do značné míry závisí na zeměpisných a klimatických podmínkách. Například obsah Se v rostlinách je nižší v oblastech s vysokými srážkami a jeho příjem rostlinami je do značné míry závislý na teplotě (vyšší míra při teplotách $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), zatímco koncentrace Fe v pastvinách vykazuje sezónní výkyvy s maximy na jaře a na podzim. Markovic et al. (2009) zdůrazňují, že koncentrace stopových prvků jsou ovlivněny fází vývoje rostlin, vyšší obsahy Fe, Zn a Cu byly zjištěny v listech vojtěšky v první fázi vývoje rostlin. Hansen a Spears (2009) doplňují, že obsah stopových prvků ovlivňuje také konzervace píce a například proces fermentace siláže zvyšuje biologickou dostupnost Fe. Kromě rozdílů v obsahu stopových prvků v rostlinách může mít na koncentrace stopových prvků vliv i míra kontaminace rostlin půdou, zejména u prvků, které se v půdě vyskytují v mnohem vyšších koncentracích než v rostlinách. Čerstvá píce a siláž jsou s větší pravděpodobností kontaminovány půdou než seno (Orjales et al., 2018).

Cortinhas et al. (2012) zmiňují, že stopové minerály Zn, Cu a Se se podílejí na metabolismu vitamínů, syntéze bílkovin a imunitním systému zvířat, to může ovlivnit zdraví, reprodukční stav a laktační výkonost u dojnic. Využití stopových prvků z organických zdrojů ve výživě zvířat, které jsou biologicky dostupnější než prvky z anorganických zdrojů, může být důležitým nástrojem pro produkci mléka a udržení zdraví.

Marounek (2009) uvádí, že živočišné produkty jsou spolehlivějším zdrojem Se než rostliny a také, že zvířata lépe zabudovávají přijatý selen do tkání. Kvíčala (2018) zase uvádí, že nejvyšší koncentrace selenu u zvířat se nachází ve štítné žláze, endokrinně aktivních tkáních a ve vnitřnostech, které jsou důležité pro lidskou výživu.

López-Alonso et al. (2016) ve své studii zjistili nedostatek minerálních látek jodu a selenu v ekologickém chovu dojnic ve Španělsku. Ekologické mléko má nižší obsah minerálních látek než u konvenčního chovu založený na pastvině ve stejné oblasti. Proto by bylo vhodné v ekologickém chovu hledat vhodnou alternativu k minerálním doplňkům diety, kterou mohou být mořské řasy, které obsahují vysoký obsah selenu i jodu. Orjales et al. (2018)

zdůrazňují, že také záleží na oblasti, ve které se ekologické chovy nacházejí, protože za následkem nízké koncentrace jodu může být i vzdálenost od moře.

Přídavek selenizované řasy má tu výhodu, že řasa je kultivována v přesně definovaných a regulovatelných podmínkách a zastoupení selenu a dalších prvků lze podle potřeby upravovat. Navíc v případě selenu obsahuje tento prvek navázaný v organických sloučeninách, což znamená i lepší využitelnost tohoto prvku ve srovnání s minerálními doplňky. Selenizovaná řasa je také stabilním zdrojem selenu, nezávislým na dostupnosti selenu v půdě nebo na ročním období jako je tomu u běžné rostlinné produkce.

7 Závěr

- Selen má velký význam pro lidské zdraví a pro přirozené fungování organismu. U zvířat se selen podílí především na antioxidační obraně, imunitě a metabolismu hormonů štítné žlázy. Tato práce se zabývala doplňováním selenizované řasy do krmiva jalovice z domácího chovu, kde se analyzovaly jednotlivé komponenty krmné dávky, použitá řasa a odběry krve. Po analýze krve se zjistila vysoká koncentrace selenu a železa, která by mohla zvýšit imunitní obranyschopnost.
- Naše hypotéza, že transformace sloučenin selenu v živočišném organismu závisí na formách tohoto prvku v dietě, byla potvrzena v literárním přehledu, kdy nejlepším doplňkem je organická forma například ve formě mořských řas.
- V případě zařazení selenizované řasy do krmné dávky i nadále, a po zkonsumování masa z tohoto dobytka by se mohla zvyšovat i hladina selenu u člověka s nízkým obsahem selenu a dalších prvků obsažených v řase. To by dále mohlo pomoci ke zlepšení imunitního systému v těle a jiných pozitivních účinků.

8 Literatura

- Ahmad, M. T., Shariff, M. Yusoff, F. M., Goh, Y. M., Banerjee, S. 2020. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* **12**:328-346
- Alcantara, S., Lopes, C. C. 1998. Controlled introduction of selenium into *Chlorella cells*. *Indian Journal Experimental Biology* **36**:1286-1288
- Batista, B. L., Rodrigues, J. L., Nunes, J. A., Souza V. C. O., Barbosa Jr., F. 2009. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Analytica Chimica Acta* **639**:13-18
- Brown, K. M., Arthur, J. R. 2001. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition* **4**(2B):593-599 DOI: 10.1079/PHN2001143
- Canter, J. A., Ernst, S. E., Peters, K. M., Carlson, B. A., Thielman, N. R. J., Grysczyk, L., Udofe, P., Yu, Y., Cao, L., Davis, C. D., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., Tsuji, P. A. 2021. Selenium and the 15kDa Selenoprotein Impact Colorectal Tumorigenesis by Modulating Intestinal Barrier Integrity. *International Journal of Molecular Sciences* **22**(19):10651
- Combs, G. F. Jr, Midthune, D. N., Patterson, K. Y., Canfield, W. K., Hill, A. D., Levander, O. A., Taylor, P. R., Moler, J. E., Patterson, B. H. 2009. Effects of selenomethionine supplementation on selenium status and thyroid hormone concentrations in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* **89**(6):1808–1814 DOI:10.3945/ajcn.2008.27356
- Cortinhas, C. S., Júnior, J. E. F., Naves, J. R., Porcionato, M. A. F., Silva, L. F. P., Rennó, F. P., Santos, M. V. 2012. Organic and inorganic sources of zinc, copper and selenium in diets for dairy cows: intake, blood metabolic profile, milk yield and composition. *Revista Brasileira de Zootecnia* **41**(6):1477-1483
- DPIRD, Department of Primary Industries and Regional Development. 2019. Agriculture and Food: Selenium deficiency in cattle. Department of Primary Industries and Regional Development, Australia. Available from: https://www.agric.wa.gov.au/feeding-nutrition/selenium-deficiency-cattle?page=0%2C0#smartpaging_toc_p0_s4_h2 (accessed November 2019)
- El-Demerdash, F. M., Nasr, H. M. 2014. Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **28**:89–93
- Finley, J. W. 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews* **64**:146-151
- Flohe, L., Günzler, W. A., Schock H. H. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Letters* **32**:132–134)

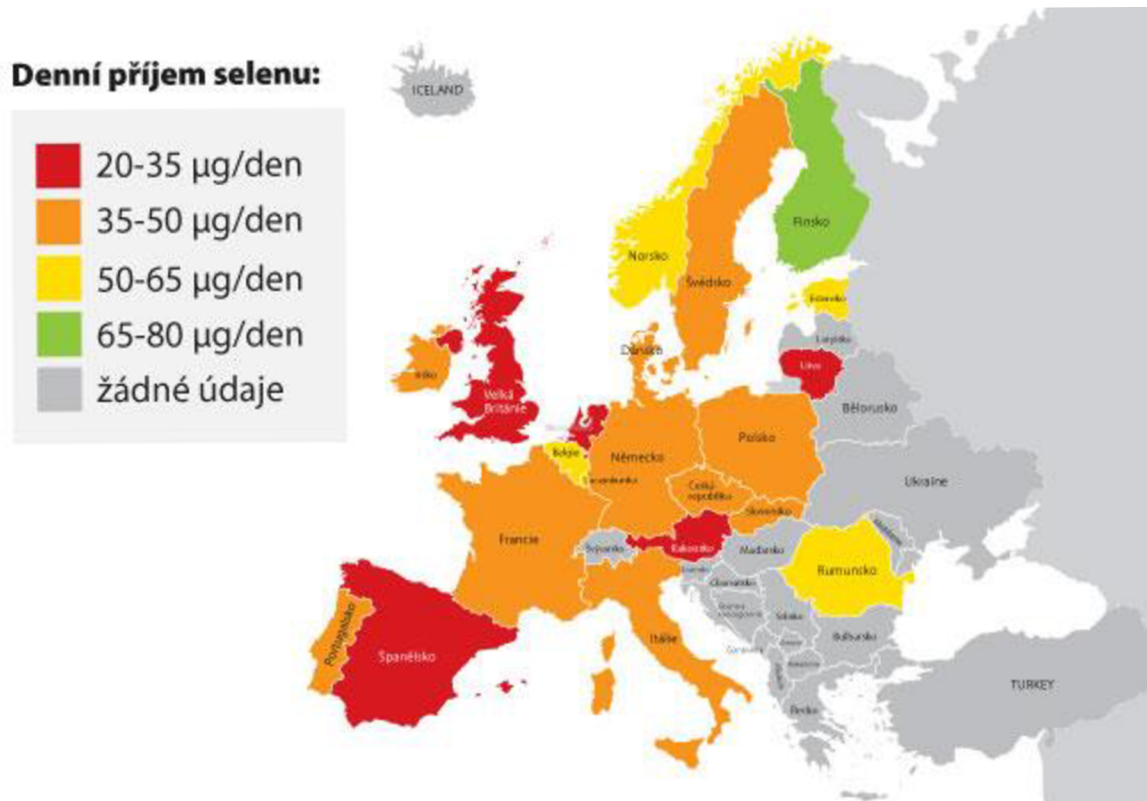
- Florian, S., Wingles, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., Kreuzer, O. J., Mexerhof, W., Brigelius-Flohé, R. 2001. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radical Research* **35**(6):655-663
- Ganther, H. E. 1974. Biochemistry of selenium. Selenium. Zingaro, Copper, Eds. Pages 546-614 in Van Nostrand Reinhold, New York.
- Gupta, U. C., Gupta, S. C. 1998. Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health: implications for management. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* **29**(11-14):1491-1522
- Hansen, S. L., Spears, J. W. 2009. Bioaccessibility of iron from soil is increased by silage fermentation. *Journal of Dairy Science* **92**(6):2896-2905.
- Herdt, T. H., Hoff, B. 2011. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* **27**:255-283
- Hudak, P. F. 2009. Elevated fluoride and selenium in west Texas groundwater. *Bulletin of Environmenta Contamination and Toxicology* **82**:39-42
- Kabata-Pendias, A. 2011. Trace elements in soils and plants/fourth editions. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton 505.
- Kieliszek, M., Błażej, S. 2013. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition* **29**:713-718
- Kvíčala, J. B. V. 2018. SELEN – nezbytná složka výživy člověka. *Výživa a potraviny* **5**:123-125
- Lei, X. G., Evenson, J. K., Thompson, K. M., Sunde, R. A. 1995. Glutathione Peroxidase and Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase are Differentially Regulated in Rats by Dietary Selenium. *The Journal of Nutrition* **125**(6):1438-1446.
- López-Alonso, M., Rey-Crespo, F., Orjales, I., Rodríguez-Bermúdez, R., Miranda, M. 2016. Effects of different strategies of mineral supplementation (marine algae alone or combined with rumen boluses) in organic dairy systems. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **100**:836-843
- Lv, Y., Yu, T., Yang, Z., Zhao, W., Zhang, M., Wang, Q. 2014. Constraint on selenium bioavailability caused by its geochemical behavior in typical Kaschin–Beck disease areas in Aha, Sichuan Province of China. *Science of the Total Environment* **493**:737-749
- Malečková R. 2022. Selen – důležitý prvek pro náš organismus. Pears Health Cyber, Praha. Available from: <https://www.lekarna.cz/clanek/selen/> (accessed October 2022)

- Manley, S. A., George, G. N., Pickering, I. J., Glass, R. S., Prenner, E. J., Yamdagni, R., Wu, Q., Gailer J. 2006. The seleno bis(S-glutathionyl) arsinium ion is assembled in erythrocyte lysate. *Chemical research in Toxicology* **19**(4):601-607
- Marković, J., Štrbanović, R., Cvetković, M., Anđelković, B., Živković, B. 2009. Effects of growth stage on the mineral concentrations in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Leaf, stem and the whole plant. *Biotechnology in Animal Husbandry*, **25**(5-6):1225-1230.
- Marounek, M., Dokoupilová, A., Volek, Z., Hoza, I. 2009. Quality of meat and selenium content in tissues of rabbits fed diets supplemented with sodium selenite, selenized yeast and selenized algae. *World Rabbit Science* **17**:207-212
- Meyer, U., Heerdegen, K., Schenkel, H., Dänicke, S., Flachowsky, G. 2014. Influence of various selenium sources on selenium concentration in the milk of dairy cows. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **9**:101-109
- Orjales, I., Herrero-Latorre, C., Miranda, M., Rey-Crespo, F., Rodríguez-Bermúdez, R. López-Alonso, M. 2018. Evaluation of trace element status of organic dairy cattle. *Animal* **12**(6):1296-1305
- Parshukova, O., Potolitsyna, N., Shadrina, V., Chernykh, A., Bojko, E. 2014. Features of selenium metabolism in humans living under the conditions of North European Russia. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **87**:607-614
- PerkinElmer, Inc. Technical Note. The 30-Minute Guide to ICP-MS. PerkinElmer, Waltham, USA. Available from: https://resources.perkinelmer.com/corporate/pdfs/downloads/tch_icpmsthirtyminuteguid.pdf (accessed December 2022)
- Poláková, Š. 2010. Obsah selenu (Se) v zemědělských půdách ČR. ÚKZÚZ, Brno. Available from: https://eagri.cz/public/web/file/240243/Obsah_selenu_Se_v_zemedelskych_pudach_C_R.pdf (accessed August 2010)
- Rayman, M. P. 2012. Selenium and human health. *Lancet* **379**:1256-68
- Reid, M. E., Stratton, M. S., Lillico, A. J., Fakih, M., Natarajan, R., Clark, L. C, Marshall, J. R. 2004. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**:69-74
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathion peroxidase. *Science* **179**:588-590
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **35**:265-278
- Skřivan, M., Marounek, M., Dlouhá, G., Ševčíková, S. 2008. Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. *British Poultry Science* **49**(4):482-486

- Skřivan, M., Šimáně, J., Dlouhá, G., Doucha, J. 2006. Effect of dietary sodium selenite, Se-enriched yeast and Se-enriched *Chlorella* on egg Se concentration, physical parameters of eggs and laying hen production. *Czech Journal of Animal Science* **51**(4):163-167
- Svoboda, M., Kotrbáček, V., Ficek, R., Drábek, J. 2009. Effect of organic selenium from Se-enriched alga (*Chlorella* spp.) on selenium transfer from sows to their progeny. *Acta Veterinaria Brno* **78**:373-377 DOI:10.2754/avb200978030373
- Ševčíková, S., Skřivan, M., Dlouhá, G., Koucký, M. 2006. The effect of selenium source on the performance and meat quality of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science* **51**(10):449-457
- Tsuji, P. A., Naranjo-Suarez, S., Carlson, B. A., Tobe, R., Yoo, M., Davis, C. D. 2011. Deficiency in the 15 kDa selenoprotein inhibits human colon cancer cell growth. *Nutrients* **3**:805-817
- Watts, D. L. 1994. The nutritional relationships of selenium. *Journal of Orthomolecular Medicine* **9**:111-117
- Whanger, P. D. 1989. China, a country with both selenium deficiency and toxicity: Some thoughts and impressions. *Journal of Nutrition* **119**:1236-1239.
- Winkel, L. H., Johnson, C. A., Lenz, M., Grundl, T., Leupin, O. X., Amini, M., Charlet, L. 2012. Environmental selenium research: from microscopic processes to global understanding. *Environmental Science and Technology* **46**(2):571-579

9 Samostatné přílohy

Příloha 1: Oblasti s nedostatkem Se v Evropě



Zdroj: <https://www.pharmanord.cz/news/jedna-z-nejdulezitejsich-mikrozivin-pomalu-mizi-z-potravinoveho-retezce>