

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor : BBI



**Magdaléna Nedvědová**

Úloha selenu v prevenci rakoviny

The role of selenium in cancer prevention

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Schierová Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.5.2012

.....

Děkuji své školitelce, RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce.

Děkuji ing. Františku Nedvědovi za pomoc technického charakteru.

Děkuji Jakubu Štěpánkovi za pomoc při hledání informací.

# Obsah

<b>OBSAH</b>	<b>1</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRAKT</b>	<b>5</b>
<b>1. ÚVOD</b>	<b>6</b>
<b>2. SELEN V LIDSKÉM TĚLE</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Metabolismus selenu</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Selenoproteiny</b>	<b>11</b>
2.2.1 Syntéza selenoproteinů	12
2.2.2 Thioredoxin reduktáza	13
2.2.3 Glutathion peroxidáza	15
2.2.4 Jodothyronin dejodináza	17
2.2.5 Ostatní selenoproteiny	17
<b>2.3 Selen a jeho role v apoptóze</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Selen a imunitní systém</b>	<b>21</b>
<b>3. SELEN A JEHO ROLE V PREVENCI A LÉČBĚ RAKOVINY</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Sloučeniny selenu indukující apoptózu u nádorových buněk</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Selenosloučeniny, poškození a opravy DNA</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Thioredoxin reduktáza v nádorových buňkách</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Sloučeniny selenu a metastáze</b>	<b>25</b>
<b>3.5 Selen a inhibice angiogeneze u nádorových buněk</b>	<b>26</b>
<b>4. KLINICKÉ TESTY</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Vliv selenu na rakovinu prostaty (NPC a SELECT)</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Antioxidační ochrana a prevence rakoviny (Linxiánský test a SU.VI.MAX)</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Vliv hladiny selenu na riziko vzniku rakoviny (NLCS)</b>	<b>30</b>
<b>4.4 Ideální klinický test</b>	<b>32</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>34</b>

## Seznam použitých zkratek

Akt – serin/threoninová protein kináza hrající roli v signalizaci  
Apaf-1 – aktivační faktor apoptotické proteázy (apoptotic protease activating factor)  
APE – purinová endonukleáza  
ApoER2 – receptor pro apolipoprotein E  
ASK1 – kináza regulovaná apoptotickým signálem (apoptosis signal-regulating kinase)  
Asn - asparagin  
ATO – oxid arsenitý  
B(+,0) rBAT – aminokyselinový transportér v tenkém střevu  
B(0) – aminokyselinový transportér v ledvinách  
B16F10 buňky – buňky melanomu  
Bak – proapoptotický efektor  
Bax – proapoptotický efektor  
BCC – karcinom bazálních buněk (basal cell carcinoma)  
Bcl-2 – protein lymfomu B-lymfocytů (B-cell lymphoma)  
Bcl-xl – protein lymfomu B-lymfocytů (B-cell lymphoma)  
BER – excitní reparace bazí (base excision repair)  
Bgn – biglykan (komponenta extracelulární matrix)  
CAD – Dnáza (enzym degradující DNA) aktivovaná kaspázou (caspase activated DNase)  
CD95 – apoptotický receptor (cluster of differentiation 95)  
Cdk2 – cyklin-dependentní kináza 2  
CI – interval spolehlivosti (confidence interval)  
Col1a1 – kolagen typu 1a1  
Ctgf – růstový faktor pojivové tkáně (connective tissue growth factor)  
Cys – cystein  
DCF – dichlorfluorescein s fluorescenční aktivitou  
DCFH – dichlorfluorescein bez fluorescenční aktivity  
DCFH-DA – dichlorfluorescein diacetát  
DIO – jodothyronin dejodináza  
DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)  
DR5 – receptor pro tumor-nekrózový faktor (TNF) (death receptor)  
DU145 buňky – nádorové buňky prostaty  
EAC – adenokarcinom jícnu (esophageal adenocarcinoma)  
eEF2 – eukaryotický elongační faktor translace  
EM – extracelulární matrix  
ERAD dráha – dráha degradace spojené s endoplazmatickým retikulem (endoplasmatic reticulum associated degradation)  
ESCC – karcinom šupinatých buněk jícnu (esophageal squamous cell carcinoma)  
FAD – flavin adenin dinukleotid

G0 – fáze buněčného cyklu (odpočinková fáze)  
G1 – fáze buněčného cyklu, post-mitotická fáze (growth phase)  
Gadd45a – protein reparující DNA (growth arrest and DNA damage-inducible protein)  
GCA – adenokarcinom žaludečního česla (gastric cardia adenocarcinoma)  
GPx – glutathion peroxidáza  
GSH – redukovaný glutathion  
H<sup>+</sup> - vodíkový kation  
HeLa buňky – lidské nádorové buňky děložního hrdla  
HR – míra rizika (hazard ratio)  
HT1080 – buňky fibrosarkomu  
HUVEC – lidské endoteliální buňky (human umbilical vessel endothelial cells)  
LNCaP buňky – nádorové buňky prostaty  
MAPK – protein kináza aktivovaná mitogenem (mitogen activated protein kinase)  
MCF-7 buňky – buňky rakoviny prsu  
MMP-2 – matrixová metalloproteináza (matrix metalloproteinase 2)  
MnSOD – mangan dependentní superoxid dismutáza  
mRNA – mediátorová RNA  
MSA – kyselina methylselenová (methaneselenoic acid)  
mSelB/eEFSec – elongační faktor specifický pro selenocystein  
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát  
NER – excitní nukleotidové reparace (nukleotide excision repair)  
NLCS – Nizozemská kohortní studie (Netherlands cohort study)  
NPC – pokus zkoumající vliv selenu na prevenci rakoviny (nutritional prevention of cancer trial)  
P21/Waf1 – inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1  
p48XPE – protein reparující DNA  
p53 – tumor-supresorový protein  
PC3 buňky – nádorové buňky prostaty  
PCNA – jaderný antigen proliferujících buněk (proliferating cell nuclear antigen)  
PI3K – 3-fosfoinositol kináza  
Pol-ε – polymeráza ε  
Ref1 – redoxní faktor  
ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku (reactive oxygen species)  
RR – relativní riziko (relative risk)  
SBP2 – protein vázající SECIS (SECIS binding protein)  
Sec – selenocystein  
SECIS – inzerční sekvence selenocysteinu (selenocystein insertion sequence)  
SecS – selenocystein syntáza  
Sek1 – aktivátor kinázy aktivovaný mitogenem (mitogen activated protein kinase activator)

SELECT – pokus zkoumající vliv selenu a vitamínu E na prevenci rakoviny (Selenium and vitamin E cancer prevention trial)

SeMet – selenomethionin

SeOH – selenol

SEPN1 myopatie – myopatie spojené s defektem genu pro selenoprotein N1

SePP – selenoprotein P

Serpinh1 – inhibitor serinové peptidázy (serine peptidase inhibitor H1)

SLC26 – aniontový transportér (solute Carrar)

Spark – kyselý sekretovaný protein bohatý na cystein (secreted protein acidit and rich in cysteine)

SRE – element vymezující selenocystein (selenocysteine redefinition element)

SSC – karcinom šupinatých buněk (squamous cell carcinoma)

SU.VI.MAX – pokus zkoumající vliv antioxidantů na prevenci rakoviny (vitamin and mineral antioxidant supplement study)

T2 – diiodthyronin

T3 – triiodthyronin

T4 – tyroxin

Timp – tkáňový inhibitor metalloproteináz (tissue inhibitor of metalloproteinases)

TNF- $\alpha$  – nekrotický faktor nádoru (tumor-necrosis factor  $\alpha$ )

tRNA – transferová RNA (ribonukleová kyselina)

TrxR – thioredoxin reduktáza

UTR – nepřekládaná oblast (untranslated region)

UV-záření – ultrafialové záření

Val - valin

VEGF – růstový faktor pro cévní endoteliální buňky (vessel endothelial growth factor)

XPC – protein reparující DNA (xeroderma pigmentosum C)

XPE – protein reparující DNA (xeroderma pigmentosum E)

## Abstrakt

Selen hraje důležitou roli v prevenci a léčbě rakoviny. Selenoproteiny, hlavně thioredoxin reduktáza a glutathion peroxidáza, chrání buňky před oxidativním stresem. Seleničitan ve fyziologických koncentracích blokuje apoptózu. Selenomethionin se účastní oprav DNA a chrání buňky proti poškození DNA. Toxicita selenu je využívána k léčbě rakoviny. Seleničitan sodný ve vysokých koncentracích indukuje apoptózu u nádorových buněk a způsobuje poškození DNA. Selenomethionin a seleničitan sodný ve vysokých koncentracích inhibují vznik metastáz díky regulaci exprese genů pro kolageny. Selen inhibuje angiogenezi, protože snižuje hladinu růstového faktoru pro endoteliální buňky (VEGF) v nádorových buňkách. Thioredoxin reduktáza chrání nejen normální buňky, ale také buňky nádorové. Její inhibitory jsou využívány k léčbě rakoviny. Klinické testy dokázaly, že nedostatečný příjem selenu zvyšuje riziko vzniku rakoviny.

**Klíčová slova** : selen, rakovina, ROS, thioredoxin reduktáza, glutathion peroxidáza, seleničitan, selenomethionin, klinické testy

## Abstract

Selenium plays an important role in cancer prevention and treatment. Selenoproteins, mainly thioredoxin reductase and glutathion peroxidase, are involved in the antioxidative defense system. Sodium selenite in physiologic concentrations blocks apoptosis. Selenomethionin takes part in DNA repair and protects cells from DNA damage. Selenium toxicity is used for cancer treatment. Sodium selenite in high concentrations induces apoptosis in tumor cells and also causes DNA damage. Selenomethionin and sodium selenite in high concentrations inhibit metastasis due to regulation of gene expression for collagen. Selenium inhibits angiogenesis, because it decreases vesicular endothelial growth factor (VEGF) amount in tumor cells. Thioredoxin reductase protects normal as well as tumor cells. Inhibitors of its activity are used for cancer treatment. Clinical trials established, that low selenium intake increases the risk of cancer.

**Keywords** : selenium, cancer, ROS, thioredoxin reductase, glutathion peroxidase, selenite, selenomethionine, clinical trials



# 1. Úvod

Selen je stopový prvek a je pro člověka esenciální. A.L. Moxon v roce 1937 identifikoval selen jako toxický prvek, který způsobuje tzv. alkalickou nemoc dobytka (Moxon et al. 1937). Pozitivní účinek selenu objevil Klaus Schwarz v roce 1957 a změnil tím pohled na tento prvek. Identifikoval první nemoc spojenou s nedostatkem selenu u krysa a tím potvrdil, že selen je pro savce esenciální. (Schwarz et al. 1957)

Selen je spojen s mnoha procesy v lidském těle. Je zapojen v imunitních procesech, je nezbytný pro metabolismus thyroïdního hormonu, hraje roli v antioxidační ochraně organismu a účastní se regulačních procesů apoptózy. Selenoproteiny i nízkomolekulární sloučeniny selenu chrání lidské tělo proti velkému počtu nemocí. Patří mezi ně například kardiovaskulární nemoci, neurodegenerativní poškození a rakovina. Počet publikací, věnovaných problematice selenu a jeho využití pro lidské zdraví, se neustále zvyšuje.

Účinek selenu na buňky záleží na jeho koncentraci. Fyziologické koncentrace selenu chrání buňky před oxidativním stresem a tím snižují pravděpodobnost vzniku nádoru. Toxické koncentrace selenu naopak způsobují buněčné poškození.

Problematika prevence rakoviny je velmi aktuální, protože rakovina je jedna z nejvíce diskutovaných nemocí dnešní doby. V roce 2008 bylo odhadováno 12,66 milionů nových případů rakoviny, zahrnující všechny maligní nádory kromě rakoviny kůže jiného než melanomového původu. Počet úmrtí na rakovinu byl přibližně 7,56 milionů, což odpovídá asi 14% ze všech úmrtí. Největší podíl rakoviny na úmrtnosti je ve vyspělých částech světa, například v Evropě a Severní Americe. Nejčastější typy rakoviny jsou rakovina plic, prsu a střeva (Ferlay et al. 2010).

Výzkum týkající se prevence a léčby je důležitý, protože některé nádory jsou stále neléčitelné a některé metody léčby mají vedlejší účinky. Objevování nových léků je tedy žádoucí.

Cílem mojí práce je zhodnotit spojení selenu s rakovinou a dokázat jeho pozitivní úlohu v prevenci a léčbě. V první části práce popisuji důležitost selenoproteinů a nízkomolekulárních sloučenin selenu v lidském těle a princip fungování těchto sloučenin v prevenci rakoviny. Druhou část věnuji využití toxických účinků vysokých koncentrací selenu při léčbě rakoviny. Ve třetí části porovnávám a kriticky hodnotím výsledky některých klinických testů, které většinou prokázaly pozitivní vliv selenu na prevenci rakoviny.

## 2. Selen v lidském těle

Selen patří mezi chemické prvky, které jsou pro člověka esenciální. V přírodě se vyskytuje v různých formách (tab.1). Podle periodické soustavy prvků má protonové číslo 34 a patří mezi chalkogeny společně s kyslíkem a sírou. Selen a síra mají mnoho společných vlastností. Co se týče elektronové konfigurace, jsou to  $p^4$  prvky - mají 4 valenční elektrony v orbitalu p. Atomy síry a selenu mají podobnou velikost, proto jsou v jednotlivých sloučeninách zastupitelné (například cystein/selenocystein). (Collins et al. 2012)

Tabulka 1. Chemické formy selenu v prostředí	
oxidační stav	chemická forma
$Se^{2-}$	selenid ( $Se^{2-}$ , $HSe^-$ , $H_2Se_{aq}$ )
$Se^0$	elementární selen
$Se^{4+}$	seleničitan ( $SeO_3^{2-}$ , $HSeO_3^-$ , $H_2SeO_{3aq}$ )
$Se^{6+}$	selenan ( $SeO_4^{2-}$ , $HSeO_4^-$ , $H_2SeO_{4aq}$ )
org. sloučeniny	selenomethionin, selenocystein

Tab.1 Chemické sloučeniny selenu v prostředí

Selen se v prostředí vyskytuje ve formě anorganických iontů (selenid, seleničitan, selenan), jako elementární selen a nebo ve formě organických sloučenin (selenocystein, selenomethionin). (Fordyce 2005)

Primárním zdrojem selenu je půda. Obsah selenu záleží na tom, ze které horniny půda vznikla. Velké množství selenu najdeme v jílu, břidlici, pískovci a vápenci. Průměrný obsah selenu v půdě čítá 0,4 mg/kg, ale rozdíly mezi jednotlivými oblastmi jsou obrovské. Půdy jsou většinou chudé na selen a obsahují 0,01 – 0,2 mg/kg. Existují však i půdy bohaté na selen, které mohou obsahovat až 1200 mg/kg. Tyto půdy se nacházejí v USA, Kanadě, jižní Americe, Číně a Rusku. Ne však po celém území těchto států, ale jen v určitých částech. Na těchto místech vznikla půda z hornin bohatých na selen. V USA je to například Utah, Wisconsin, Texas a další státy střední části USA. Půdy bohaté na selen se také vyskytují na severozápadě Číny. V Číně jsou ale i oblasti, kde je kritický nedostatek selenu (severovýchod a jihozápad země), a proto se zde vyskytují nemoci s tím spojené – Keshanova nemoc a Kashin-Beckova nemoc. Do plodin a ostatních rostlin se selen dostává ve formě solí, hlavně jako selenan ( $Se^{6+}$ ) a seleničitan ( $Se^{4+}$ ). (Fordyce 2005 a Jian'an Tan et al. 2002)

Obsah selenu v plodinách závisí na půdě, ve které jsou tyto plodiny pěstovány. Mezi potraviny bohaté na selen patří : brazilské ořechy (0,03 – 512 mg/kg), chleba a cereálie (0,01 – 30 mg/kg), maso (0,03 – 0,15 mg/kg pro hovězí, vepřové a jehněčí), vnitřnosti (0,2 – 2,0 mg/kg pro játra a ledviny), ryby (0,42 mg/kg v průměru). Méně selenu je obsaženo v mléku, ovoci a zelenině s výjimkou česneku (0,02 mg/kg v průměru) a brokolice (Combs 2001). Když zelenina nebo ovoce rostou na půdách obsahujících velké množství selenu, je tím jejich složení podstatně ovlivněno. Podíl selenu je pak nesrovnatelně vyšší. (Fordyce 2005)

Selen se v potravě vyskytuje ve formě anorganických solí (selenan, seleničitan) a ve formě organických sloučenin (selenomethionin, selenocystein,  $\gamma$ -glutamyl-Se-methylselenocystein, Se-methylselenocystein).

Příjem selenu závisí na jeho dostupnosti, liší se geograficky. Je také ovlivněn dietními návyky jednotlivce. V evropských zemích je průměrný příjem na člověka velmi nízký. Například ve Francii 29 – 43  $\mu\text{g}/\text{den}$  nebo v Maďarsku 41 – 92  $\mu\text{g}/\text{den}$ . Naopak v zemích, kde je půda bohatá na selen, se příjem pohybuje ve vyšších hladinách. (v USA 60 – 220  $\mu\text{g}/\text{den}$ , ve Venezuele 200 – 350  $\mu\text{g}/\text{den}$ ). V Číně pozorujeme velké rozdíly v příjmu selenu. V oblastech bohatých na selen se příjem pohybuje mezi 750 – 4990  $\mu\text{g}/\text{den}$ , naopak v oblastech velmi chudých na selen je příjem 7 – 11  $\mu\text{g}/\text{den}$ . (Combs 2001)

Selen je pro lidské zdraví nezbytný, optimální příjem je 50 – 200  $\mu\text{g}/\text{den}$ , avšak denní příjem nad 400  $\mu\text{g}/\text{den}$  je pro člověka toxický. (World health organization 1996). Otrava selenem se projevuje mnoha symptomy, jako jsou žaludeční nevolnost, zvracení, lámání a ztráta nehtů, ztráta vlasů, únava, podrážděnost a typický „česnekový“ odér z úst. (MacFarquhar et al. 2010)

Obsah selenu v jednotlivých tkáních se liší. V kůře ledvin je to 576  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ve štítné žláze 363  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , v játrech 308  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ve slezině 205  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , v mozkové kůře 111  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a v hypofýze 545  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Tyto hodnoty byly naměřeny ze vzorků získaných autopsií (pitva a diagnóza tkání) 133 osob. Koncentrace selenu byla stanovena elektrotermální atomovou absorpční spektrometrií. Koncentrace selenu v tkáních se mohou měnit v závislosti na příjmu selenu. Záleží také na věku a pohlaví. (Drasch et al. 2000)

## 2.1 Metabolismus selenu

Metabolismus selenu zatím není dostatečně probádaný. Záleží na typu sloučeniny, která je metabolizována. (obr.1)

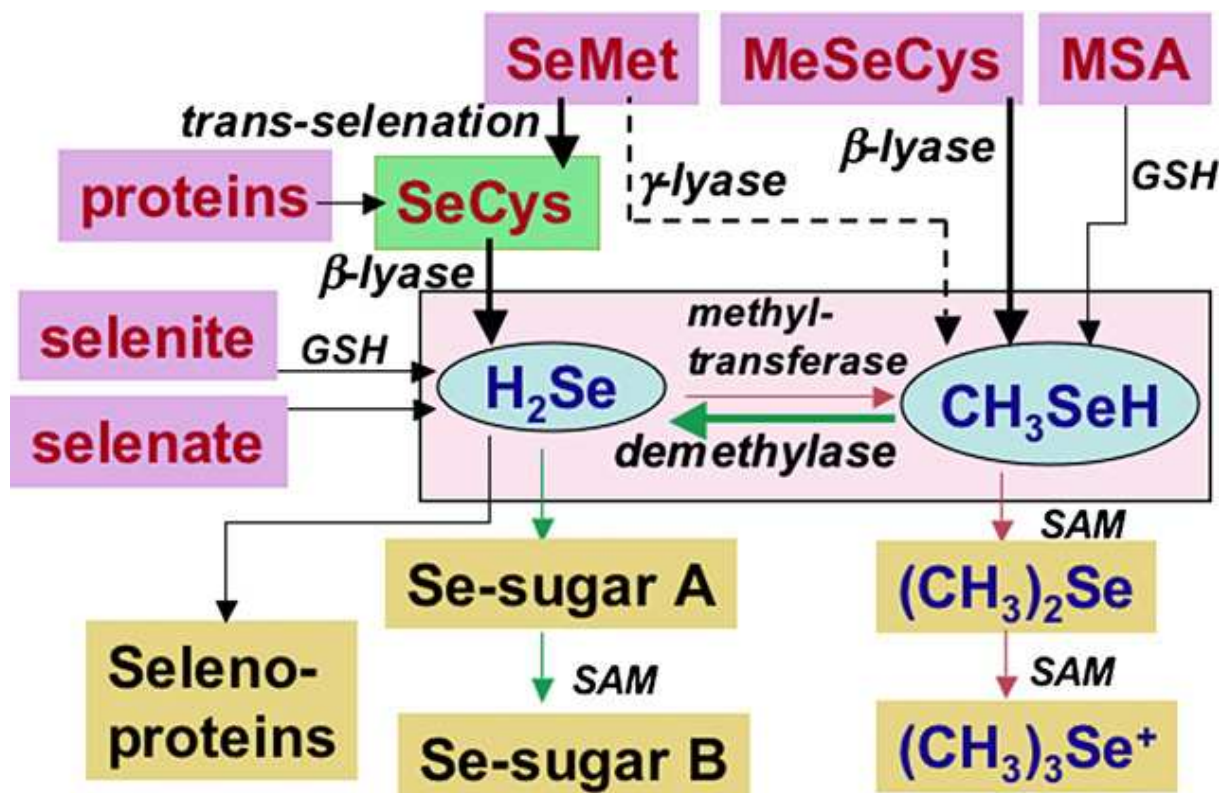
Selen zabudovaný do aminokyselin (selenomethionin, selenocystein, methylselenomethionin) se dostává do těla aminokyselinovými transportéry, z ledvin pravděpodobně systémem B(0) a z tenkého střeva systémem B(+,0) rBAT. Tyto transportéry přenáší aminokyseliny (cystein, methionin) a s téměř stejnou afinitou také jejich analogy obsahující selen. Tato skutečnost však byla prokázána jen u selenomethioninu, selenocystein má k přenašečům nižší afinitu. (Nickel et al. 2009).

Selenan je nejspíš přepravován aniontovým transportérem SLC 26. (Tato skutečnost je předpokládána u bakterií na základě toho, že selenan je analog síranu.) Člověk může přijímat selenan ve formě selenanu sodného,  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ . (Zolotarev et al. 2008).

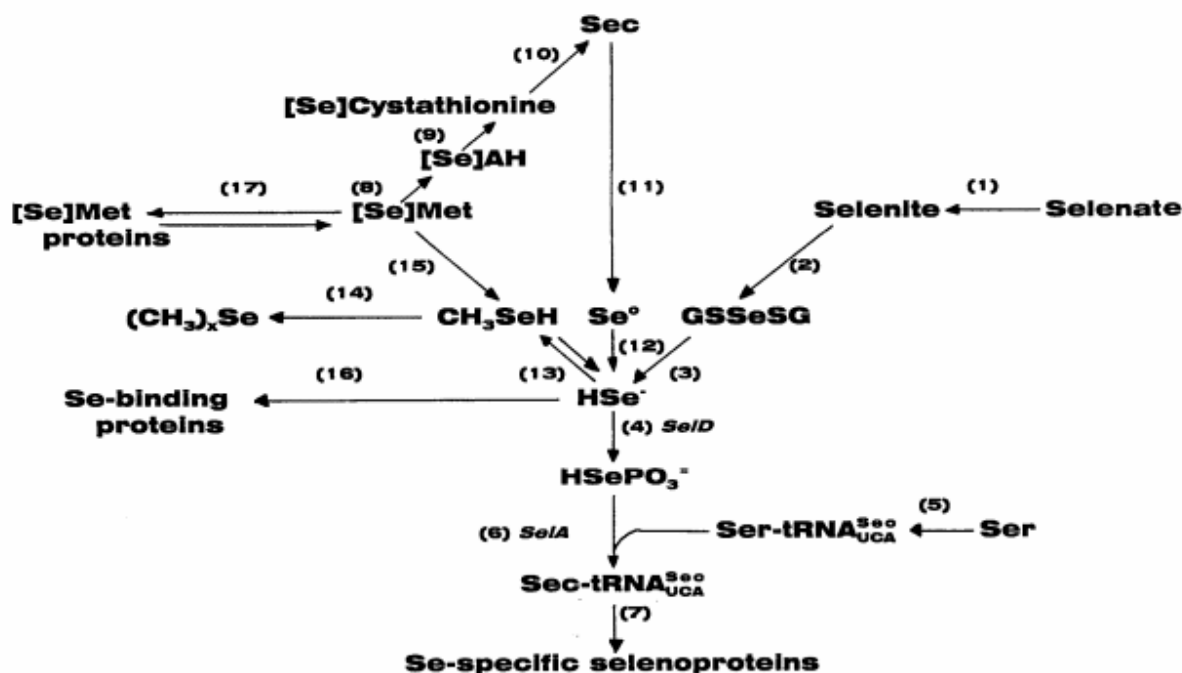
Zabudování selenu do selenoproteinů vyžaduje soubor komplexních drah. Důležitou sloučeninou pro tento proces je selenid,  $\text{H}_2\text{Se}$ . Hraje roli v metabolismu organických i anorganických sloučenin selenu. Selenocystein je enzymem  $\beta$ -lyáza přeměněn na methylselenol, což je další důležitá sloučenina v metabolismu selenu. Methylselenol je následně hydrolyzován na selenid a methanol pomocí methylselenol demethylázy. Selenomethionin je buď přeměněn  $\gamma$ -lyázou na methylselenol anebo je transformován na selenocystein. Enzym  $\gamma$ -lyáza také přeměňuje Se-methyl-selenocystein na methylselenol (Drake 2006 a Suzuki et al. 2007). Seleničitan je redukován thioredoxin reduktázou na selenid. (Thioredoxin reduktáza je selenoprotein). Selenan se přemění na selenid podobně jako seleničitan. Selenid je zabudován do selenoproteinů díky jeho přeměně na selenofosfát. Reakci katalyzuje selenofosfát syntetáza. (Veres et al. 1994)

Nadbytečný selen je vyloučen močí ve formě selenocukrů. Methylselenol může být, zejména v ledvinách, methylován na dimethylselenid a pak na trimethylseleniový ion. Tyto methylované sloučeniny jsou vyloučeny močí. (Suzuki et al. 2007)

Pro transport selenu je důležitý plazmatický selenoprotein SePP. Je to glykosylovaný protein a jeho N-terminální konec obsahuje 1 selenocysteinový zbytek. C-terminální doména obsahuje 9 selenocysteinových zbytků a zvyšuje tím kapacitu pro přenos Se. Selen je pro syntézu SePP esenciální - koncentrace proteinu poklesne, pokud poklesne koncentrace selenu. Selenoprotein SePP je přítomen v celém těle, důležitý je hlavně v mozku, ledvinách a varlatech. Do tkání se SePP dostává přes lipoproteinový receptor ApoER2. (Burk, Hill 2009)



Obr.1 Navrhovaná metabolická dráha ukazující demetylací methylselenolu na selenid. Předpokládá se, že veškerý selen přijímaný v potravě je konvertován na selenid buď přímo nebo přes methylselenol. Anorganické ionty, selenan (selenate) a seleničitan (selenite) jsou redukovány na selenid. Selenocystein ze selenoproteinů je přeměněn na selenid β-lyázou. Selenomethionin je transformován na selenid přes meziprodukt methylselenol enzymem γ-lyáza nebo může být přeměněn na selenocystein a ten je posléze transformován na selenid β-lyázou. Methylselenocystein je přeměněn na methylselenol β-lyázou. Kyselina methylselenová je redukována na methylselenol. Methylselenol je demetylován na selenid a poté využit na syntézu selenoproteinů nebo je exkretován ve formě selenocukrů. Methylselenol může být také methylován na dimethylselenid a trimethylselonium a pak vyloučen močí. (Suzuki et al. 2007)



Obr. 2 Schéma metabolismu selenu

Selenan je přeměněn na seleničitan (1), ten je transformován na selenid (2,3). Selenid je fosforylován a vzniká selenofosfát (4). Ten je nezbytný pro vznik speciální tRNA pro selenocystein (6). Selenomethionin je přeměněn na selenocystein (8,9,10) a ten je transformován na selenid (11,12). Selenid může být methylován na methylselenol a methylselenol na dimethylselenid (13,14). Selenomethionin také může být přeměněn přímo na selenid (15) nebo může být zabudován do proteinů (17). (Sunde 1999)

## 2.2 Selenoproteiny

Selen je nezbytným prvkem pro syntézu selenocysteinu, který je často označován jako 21. aminokyselina. Selenocystein je kódován kodónem UGA, který obvykle funguje jako stop kodón. (Xue-Ming Xu et al. 2007)

Většina selenoproteinů (např. glutathion peroxidáza, thioredoxin reduktáza) hraje roli v antioxidantním systému a tím chrání buňky před poškozením. Dejodinázy se účastní metabolismu thyroïdního hormonu. Selenoproteiny také ovlivňují imunitní systém, chrání proti neurodegeneraci a kardiovaskulárním onemocněním a nejspíš také zabraňují vzniku rakoviny. (Reeves, Hofmann 2009) Téma rakoviny shrnují ve své bakalářské práci v kapitole 3. Funkce některých selenoproteinů ještě nebyla objevena. Některé selenoproteiny jsou 100 krát efektivnější než jejich cysteinové homology. (Hwa-Young, Gladyshev 2005)

U člověka bylo nalezeno 25 genů kódujících selenoproteiny. Selenoproteiny se dělí do dvou hlavních skupin. U první skupiny se selenocystein nachází blízko C-terminální části proteinu, naopak u druhé skupiny je selenocystein lokalizován na N-konci.

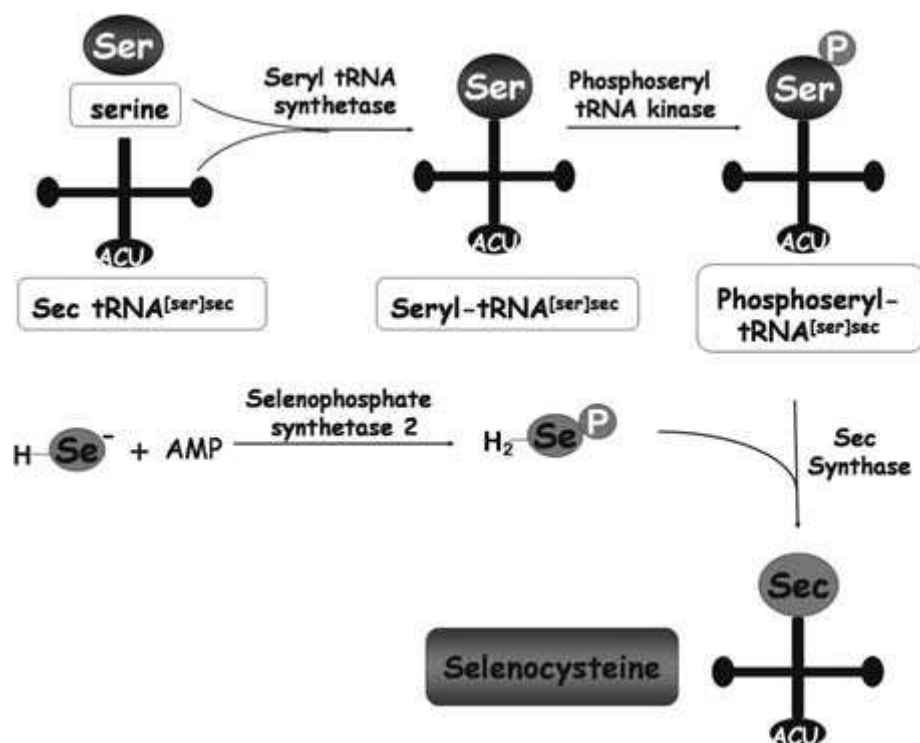
Antioxidační ochrana spočívá v tom, že selenoproteiny zmírňují poškození způsobené ROS. (Například glutathion peroxidáza redukuje hydrogen peroxidy na vodu – viz kapitola 2.2.3 Glutathion peroxidáza). Protože ROS (například peroxid vodíku,  $H_2O_2$ ) fungují jako signalizační molekuly, mohou být selenoproteiny důležitými regulátory redoxní signalizace. (Schreck et al. 1991)

Selenoproteiny jsou pro člověka nezbytné, důkazem může být Keshanova nemoc, přítomna hlavně v Asii. Tato nemoc je způsobena nedostatečným příjmem selenu v kombinaci s virovým onemocněním, které způsobuje Coxsackievirus. Nedostatečný příjem selenu způsobí nedostatek selenoproteinů, které chrání před oxidativním stresem. (viz kapitoly 2.2.2, 2.2.3 a 2.2.5) (Jian'an Tan et al. 2002)

Selenoproteiny vykazují různou tkáňovou i buněčnou distribuci. Některé se vyskytují takřka všude (SePP, GPx1), jiné jsou tkáňově specifické (Trx3 je exprimován ve varlatech). Existují selenoproteiny transmembránové (SelS), organelové (GPx4 se vyskytuje v mitochondriích), ale také plazmatické (GPx3) a některé jsou přítomny v extracelulární matrix (Je jich celkem 7 a patří mezi ně DIO2, SelK, SelM, SelN, SelT, Sel15, SelS.) (Shchedrina et al. 2010 a Reeves, Hofmann 2009)

### 2.2.1 Syntéza selenoproteinů

Inzerce selenu do proteinů vyžaduje speciální vlásenkovou strukturu, takzvanou sekvenci SECIS. Tato struktura lokalizována na 3' UTR a ve spojení s kodónem UGA, který je běžně čten jako stop kodón, pomáhá inkorporaci selenocysteinu do proteinů. Pro účinnou inkorporaci selenocysteinu se musí translace účastnit mnoho dalších faktorů. Nezbytná je speciální tRNA s navázaným selenocysteinem tRNA[Ser]Sec, která se účastní exprese veškerých selenoproteinů. (Lee et al. 1989) Tato tRNA vzniká ze seryl-tRNA. Ta je fosfoseryl tRNA kinázou konvertována na fosfoseryl-tRNA a poté je přeměněna na selenocystein-tRNA. Tuto reakci katalyzuje selenocystein syntáza. Dalšími nezbytnými faktory jsou protein vázající SECIS (SBP2), speciální elongační faktor (mSelB/eEFSec), ribozomální protein L30 a další. U některých selenoproteinů byla objevena sekvence SRE, která doplňuje funkci SECIS. Od SECIS se liší tím, že se vyskytuje v překládané oblasti mRNA. Selen je důležitým posttranskripčním regulátorem, protože ovlivňuje stabilitu mRNA pro selenoproteiny. (Papp et al. 2007 a Xue-Ming Xu et al. 2006)



Obr. 3 Syntéza selenocystein-tRNA v savčích buňkách

Syntéza selenocystein-tRNA začíná připojením serinu na tRNA seryl-tRNA syntetázou za vzniku seryl-tRNA. Fosfoseryl tRNA kináza fosforyluje tento komplex. Selenid je přeměněn na selenofosfát enzymem selenofosfát syntetáza. Fosfoseryl-tRNA a selenofosfát vytvoří konečný produkt dráhy : tRNA nabitou selenocysteinem. (Papp et al. 2007)

### 2.2.2 Thioredoxin reduktáza

Thioredoxin reduktáza (TrxR) je součástí thioredoxinového systému společně s thioredoxinem (Trx) a NADPH. Tento systém je považován za hlavní redoxní systém v savčích buňkách. Thioredoxin reduktáza je jediný enzym redukující thioredoxin (Reeves, Hofmann 2009 a Holmgren 1989). Substrátem pro TrxR jsou také peroxid vodíku, lipid hydroxyperoxid, askorbát, kyselina lipoová, chinon, NK-lyzin (efektorový peptid T-lymfocytů), alloxan (toxický analog glukózy) a tumor-supresorový protein p53. (Reeves, Hofmann 2009 a Mustacich et al. 2000)

Thioredoxin reduktáza je flavoprotein, což znamená, že obsahuje flavin adenin dinukleotid (FAD). Funkční je ve formě homodimeru, každý monomer obsahuje prostetickou skupinu FAD, doménu vázající NADPH a aktivní místo s redox-aktivním disulfidovým můstkem. Enzym TrxR se tvoří i při nestresových podmínkách. Je to enzym nezbytný pro lidský život. Thioredoxin reduktáza 2 je navíc esenciální pro životaschopnost



kardiomyocytů a tudíž pro správný vývoj srdeční tkáně. (Reeves, Hofmann 2009 a Mustacich et al. 2000)

U vyšších eukaryot včetně člověka se vyskytuje typ s vysokou molekulovou hmotností (58 kDa), který obsahuje selenocystein. Naproti tomu u prokaryot a kvasinek najdeme typ s nízkou molekulovou hmotností, 35 kDa, bez selenocysteinu (Holmgren 1989). Tyto dva enzymy vykazují sekvenční homologii pouze 31%, zatímco eukaryotická TrxR je ze 44% homologní s prokaryotickou i eukaryotickou glutathion reduktázou (Mustacich et al. 2000). U člověka se objevují 3 izoenzymy – TrxR1, což je cytosolický enzym, TrxR2, který se vyskytuje v mitochondriích a TrxR3 primárně exprimovaný ve varlatech. (Reeves, Hofmann 2009)

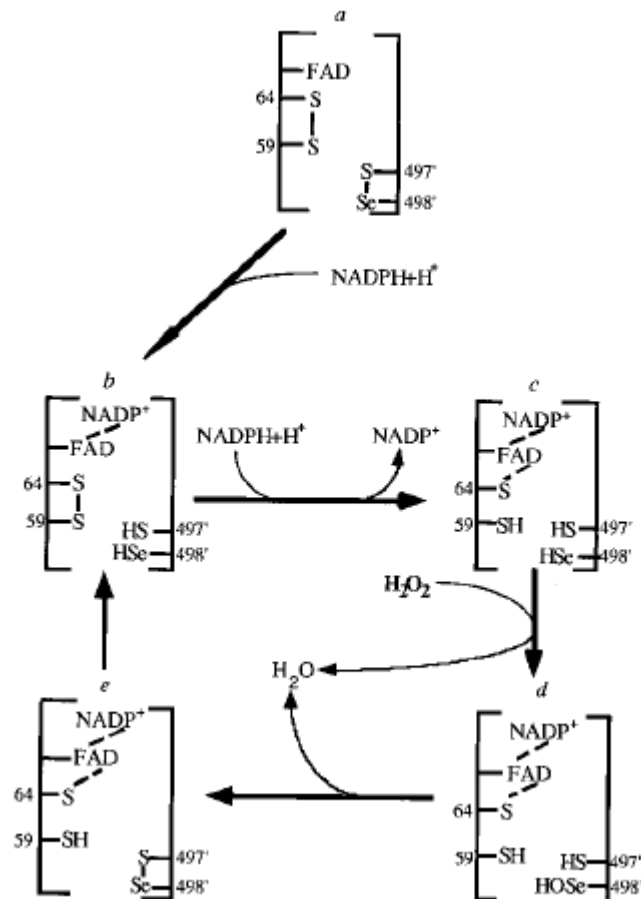
Struktura enzymu u savců vypadá takto : N-terminální konzervovaný motiv Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys a C-terminální aktivní místo Gly-Cys-Sec-Gly. Sec je selenocystein, který je vyžadován pro katalytickou aktivitu enzymu. Navíc enzym obsahující selenocystein může fungovat i při kyselém pH, což poukazuje na jeho výhodnost. (Mustacich et al. 2000 a Reeves, Hofmann 2009)

Mechanismus působení TrxR je jednoduchý. Pokud k enzymu nejsou navázány prostetické skupiny (FAD a NADPH), jsou vazebné domény daleko od sebe. Po navázání prostetických skupin se domény přiblíží a elektrony z NADPH se přemístí na FAD a odtud pak na S-S můstek. Elektrony jsou potom využity k redukci dalších substrátů, například thioredoxinu. (Mustacich et al. 2000)

Thioredoxin patří mezi hlavní buněčné disulfid reduktázy. Redukovaný thioredoxin poskytuje elektrony ribonukleotid reduktáze (ta je nezbytná pro syntézu DNA), disulfid izomeráze, methionin sulfoxid reduktáze. Může také regulovat růst lidských T-lymfocytů a dalším jeho substrátem je seleničitan sodný, který také ovlivňuje růst buněk. (Holmgren 1989)

Thioredoxinový systém je úzce spojen s hladinou selenu. Selen je regulátorem exprese TrxR, navíc systém katalyzuje redukci sloučenin obsahujících selen (seleničitan, selenodiglutathion) a poskytuje H<sup>+</sup> glutathion peroxidáze. (Reeves, Hofmann 2009 a Mustacich et al. 2000)

Thioredoxin reduktáza sice chrání buňky proti oxidativnímu stresu, ale ochraňuje i buňky nádorové. O tom se podrobněji zmiňuji v kapitole 3.3 Thioredoxin reduktáza v nádorových buňkách.



Obr. 4 Schéma působení thioredoxin reduktázy na  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Zhong et al. 2000)

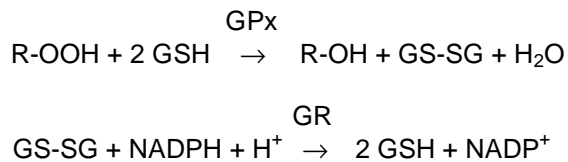
Reakce začíná oxidovanou formou TrxR (a). K enzymu se připojí prostetická skupina NADPH a přiblíží se k FAD. Se-S se redukuje na SeH a SH elektrony získanými od NADPH přes FAD (b). Druhá molekula NADPH redukuje S-S na cysteinech na SH (c). Thioredoxin reduktáza redukuje  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  za vzniku SeOH (d). Regenerace enzymu zpět na oxidovanou formu, obnovení vazby Se-S. (e)

### 2.2.3 Glutathion peroxidáza

Glutathion peroxidáza (GPx) patří mezi nejvíce probádané selenoproteiny a jeho hlavní funkcí je ochrana před oxidativním stresem. Používá glutathion (tripeptid složený z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu) k redukci peroxidu vodíku (na vodu) a fosfolipid peroxidů (na jejich odpovídající alkoholy). (Kulinsky, Kolenischenko 2007)

GPx patří mezi peroxidázy, tzn. redukuje peroxidy. Existuje celkem 8 izoenzymů, všechny byly nalezeny u člověka. Jen 5 z nich ale obsahuje selenocystein (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 a GPx6). GPx1 až 3 jsou homotetramery, GPx4 je monomer. GPx6 není dosud dostatečně probádán. (Reeves, Hofmann 2009)

Glutathion funguje jako donor elektronů. Mechanismus působení GPx je takový, že selen na selenocysteinu je oxidován peroxidem na SeOH, ten pak reaguje s glutathionem (GSH) za vzniku GS-Se a vody. GS-Se reaguje s dalším GSH, uvolní se selen a vznikne GS-SG (glutathion disulfid – oxidovaná forma). Glutathion disulfid je regenerován na glutathion enzymem glutathion reduktázou.



Obr. 5 Zjednodušené schéma působení GPx (R-OOH – organický peroxid, GSH – redukovaný glutathion, R-OH – alkohol, GS-SG – glutathion oxidovaný, GR – glutathion reduktáza)

GPx1 je exprimován ve všech tkáních, hlavně však v červených krvinkách, játrech, plicích a ledvinách. V buňkách se vyskytuje v cytosolu, jádře a mitochondriích. Je velmi citlivý ke změnám hladiny selenu. GPx1 hraje důležitou roli ve zotavení buněk po jejich poškození oxidativním stresem. Zabraňuje vzniku rakoviny, neurodegenerativních onemocnění a také vzniku kardiovaskulárních nemocí. (Blankenberg et al. 2003 a Reeves, Hofmann 2009)

GPx2 se vyskytuje v epiteliálních buňkách gastrointestinálního traktu, u lidí i v játrech. Je nejspíš zapojen do proliferace buněk a chrání střevní epitel před oxidativním stresem pocházejícím z peroxidů přijímaných v potravě. Glutathion redukuje množství peroxidů transportovaných ze střevního lumen. Stejně jako GPx1, ochraňuje tělo proti vzniku rakoviny, protože potlačuje mutagenní potenciál peroxidů. GPx2 je stabilní i při deficitu selenu. (Brigelius-Flohé 1999)

GPx3 je sekretovaný enzym a jeho hlavní místo působení je v krevní plazmě. Tento enzym je produkován buňkami proximálního tubulu a buňkami Bowmanova váčku v ledvinách a pak je uvolněn do krve. V krvi nejspíš redukuje peroxidy a tím zabraňuje jejich šíření do dalších tkání. Enzym se vyskytuje také v srdci, štítné žláze a dalších tkáních, kde chrání proti oxidativnímu poškození. Je také syntetizován trofoblasty během fetálního vývoje. (Brigelius-Flohé, 1999)

Pouze izoenzym GPx4 je pro člověka esenciální. Jako substráty mu slouží fosfolipid hydroxyperoxydů v membránách. GPx4 je také zapojen do metabolismu lipidů, funguje jako senzor oxidativního a buněčného stresu, ovlivňuje vývoj tkání a chrání proti neurodegenerativním nemocem (Alzheimerova a Parkinsonova choroba). Je také

důležitým strukturním proteinem ve spermatidách a je tedy možné, že GPx4 souvisí se samčí fertilitou. (Reeves, Hofmann, 2009). Bylo dokázáno, že alela genu pro Gpx4 se substitucí cytosinu za thymin v pozici rs713041 zvyšuje riziko rakoviny tlustého střeva a konečníku. K substituci dochází v místě, které interaguje s 3' UTR a ovlivňuje tedy syntézu proteinu. (Méplan et al. 2010)

GPx6 potřebuje hlubší zkoumání. Z jediné studie bylo zjištěno, že se exprimuje během embryogeneze a v očním epitelu. (Kryukov et al. 2003)

#### 2.2.4 Jodothyronin dejodináza

Jodothyronin dejodináza (DIO) katalyzuje přeměnu prohormonu tyroxinu (T4) na hormon trijodthyronin (T3) a tím udržuje správnou hladinu thyroidního hormonu ve štítné žláze.

Jsou známy 3 izoenzymy, které se liší sekvenčně i svými vlastnostmi. Všechny jsou dimerické integrální membránové proteiny s jedním transmembránovým segmentem. V aktivním místě se nachází 1 selenocystein a 2 histidiny. (Bianco et al. 2002)

Mechanismy působení jsou různé. Všechny formy však hrají roli v kontrole koncentrace aktivního thyroidního hormonu v různých tkáních a v různých stádiích vývoje.

DIO1 přeměňuje T4 na aktivní formu T3. Jeho další funkcí je přeměna T3 na neaktivní T2 (dijodthyronin). Enzym je zakotven v plazmatické membráně a katalyzuje vznik thyroidního hormonu především ve štítné žláze a periferních tkáních, odkud je pak exportován do plazmy. (Reeves, Hofmann 2009)

DIO2 má podobnou funkci jako DIO1, nedokáže však inaktivovat T3. Také je na rozdíl od DIO1 zakotven v membráně endoplazmatického retikula. Krátký N-terminální konec enzymu se nachází v lumen endoplazmatického retikula a katalytická globulární doména v cytosolu. Vyskytuje se v srdci, svazech, mozku, hypofýze a hnědé tukové tkáni. V tukové tkáni ovlivňuje termogenezi. (Shchedrina et al. 2010)

DIO3 katalyzuje nevratnou inaktivaci T3 a T4. Enzym je zanořen v plazmatické membráně a je exprimován ve fetální tkáni a placentě. Hraje důležitou roli ve vývoji jedince. (Reeves, Hofmann 2009)

#### 2.2.5 Ostatní selenoproteiny

Selenoprotein H je exprimován v různých tkáních, hojně se vyskytuje v raných stádiích embryonálního vývoje. Byl objeven v jádře, kde se podílí na regulaci genové

exprese. Zvyšuje transkripci genů zapojených v de novo syntéze glutathionu. Je to DNA vazebný enzym reagující na změny redoxního prostředí. Další jeho funkce nejsou zcela známy, ukázalo se však, že hraje roli v ochraně mozkových buněk proti oxidativnímu stresu a zabraňuje buněčné smrti způsobené UV zářením. (Panee et al. 2007 a Reeves, Hofmann 2009)

Přesná funkce selenoproteinu I ještě nebyla potvrzena, je nutné další bádání. Pravděpodobně je tento enzym zapojený v syntéze fosfolipidů. Obsahuje totiž CDP-alkohol fosfatidyltransferázový motiv, který je častým motivem fosfolipid syntetáz. Obsahuje 7 transmembránových helixů. Je exprimován ve všech tkáních, nejvíce v koncovém mozku. (Horibata, Hirabayashi 2006)

Selenoprotein K patří mezi malé proteiny a je lokalizován v endoplazmatickém retikulu všech buněk. N-terminální sekvence se nachází v lumen retikula a C-terminální sekvence v cytosolu. Funkce tohoto enzymu zůstává nejasná, předpokládá se, že udržuje redoxní rovnováhu. Enzym je přítomen ve všech tkáních, nejvíce je exprimován v srdci, kosterním svalstvu a slinivce. (Shchedrina et al. 2010)

Selenoprotein M a selenoprotein Sep15 jsou také lokalizovány v endoplazmatickém retikulu. Fungují nejspíš jako disulfid oxidoreduktázy. Sep15 váže UDP glukóza:glykoprotein glukosyltransferázu, která pomáhá správnému sbalování proteinů v ER. Oba enzymy mají podobný výskyt v těle, ačkoli hladina SepM je nejvyšší v mozku. Sep15 se hojně vyskytuje i v prostatě, varlatech, játrech a ledvinách. (Shchedrina et al. 2010)

Mezi další proteiny endoplazmatického retikula patří selenoprotein N, který se nachází na jeho membráně. Jsou známy 2 izoformy, z nichž jedna vzniká alternativním sestřihem (vystřížení exonu 3). Selenoprotein N hraje roli v regulaci transportu vápníku přes ryanodinový receptor u svalových buněk. Mutace v genu pro SepN způsobují četná svalová onemocnění, souhrnně nazývaná SEPN1 myopatie, které se projevují svalovou slabostí a dalšími příznaky. (Shchedrina et al. 2010)

Jedním z nejdůležitějších proteinů spojených se selenem je selenoprotein P. Je jedinečný tím, že obsahuje více selenocysteinů (konkrétně 10 u člověka). Selenoprotein P váže selen a funguje jako jeho přenašeč. Má však i další funkce – například váže heparin a účastní se boje proti infekci trypanosomami. Také chrání buňku před těžkými kovy. Vyskytuje se hlavně ve varlatech a mozku, ale také v ledvinách, srdci atd. (Burk, Hill 2009). Také ovlivňuje riziko vzniku rakoviny. Alela genu pro SePP, v níž je adenin nahrazen guaninem v pozici rs7579, tedy v místě, které interaguje s 3' UTR, výrazně

zvyšuje pravděpodobnost vzniku rakoviny tlustého střeva a konečníku. (Méplan et al. 2010)

Selenoprotein R patří mezi methionin sulfoxid reduktázy. Redukuje methioninové zbytky u proteinů, které byly oxidovány kyslíkovými radikály. Tento enzym se hojně vyskytuje hlavně v játrech a ledvinách, kde působí proti oxidativnímu stresu. Také hraje roli v redoxní regulaci a ovlivňuje životaschopnost buněk v oční čočce. (Reeves, Hofmann 2009)

Selenoprotein S je transmembránový protein endoplazmatického retikula. Je součástí tzv. ERAD dráhy, která je zodpovědná za odstranění špatně sbalených proteinů z endoplazmatického retikula. Selenoprotein S se tak účastní boje proti oxidativnímu stresu a zabraňuje apoptóze (Shchedrina et al. 2010 a Reeves, Hofmann 2009). Také je zapojen v ochraně proti vzniku rakoviny. Alela genu pro selenoprotein S, kde je thymin zaměněn za cytosin v pozici rs34713741, tedy v oblasti promotoru, zvyšuje riziko vzniku rakoviny tlustého střeva a konečníku. (Méplan et al. 2010)

## 2.3 Selen a jeho role v apoptóze

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, je proces, který je důležitý pro vývoj organismu a další buněčné procesy jako třeba stárnutí, zánět a karcinogeneze. Porucha v některém proteinu, který hraje roli v regulaci apoptózy, může být fatální. Vede k patologiím, jako je například rakovina, Alzheimerova choroba nebo AIDS. Apoptóza je charakteristická snížením objemu buněk, kondenzací chromatinu, degradací DNA a formováním tzv. apoptotických tělísek. Specifické apoptotické proteázy se nazývají kaspázy. (Chandra et al. 2000)

Existují 2 typy drah vedoucích k apoptóze. Vnější dráha začíná navázáním ligandu na transmembránové receptory CD95 nebo DR5. Následuje aktivace transmembránových aktivačních kaspáz (kaspáza-8, kaspáza-10). Tyto kaspázy štěpí a tím aktivují kaspázu-7 a kaspázu-3. Ty pak degradují další proteiny. Vnitřní dráha vyžaduje poškození mitochondriální membrány, a to způsobí vylití cytochromu c do cytosolu. Cytochrom c se naváže na Apaf-1 (faktor aktivující apoptotickou proteázu). Tento protein formuje apoptotický komplex, tzv. apoptozom a váže kaspázu-9. Apoptozom aktivuje kaspázu-7 a kaspázu-3. (Sinha, El-Bayoumy 2004)

Vnitřní dráha je ovlivněna regulačními proteiny rodiny Bcl. Jsou to proapoptické Bak a Bax a antiapoptické Bcl-2 a Bcl-xl. Nacházejí se na mitochondriální membráně.

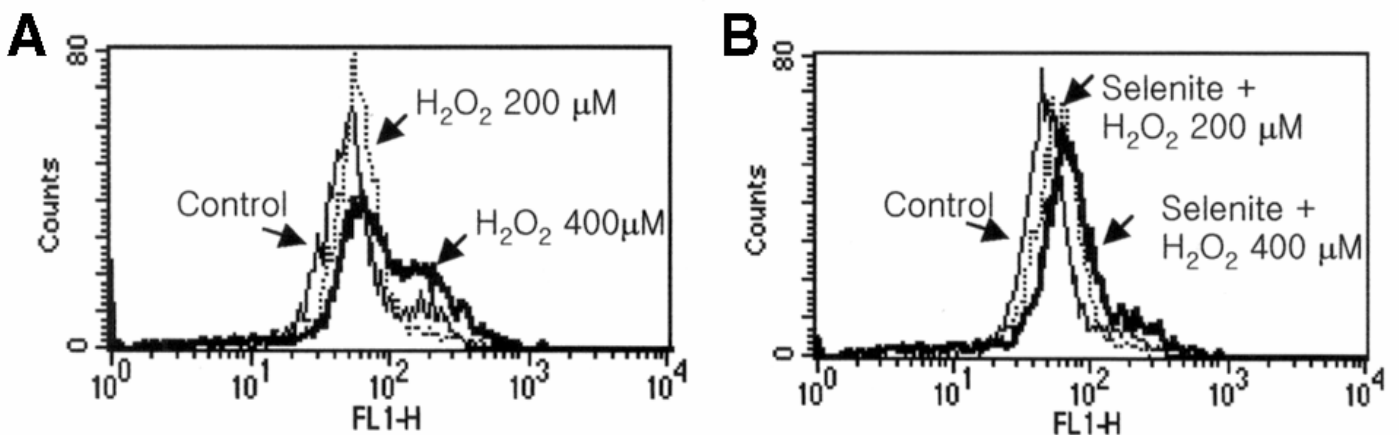
Apoptóza je většinou závislá na p53, existují však i dráhy nezávislé na tomto proteinu. (Sinha, El-Bayoumy 2004)

Seleničitan je sloučenina selenu ovlivňující apoptózu. Seleničitan při koncentraci  $<3 \mu\text{M}$  blokuje apoptózu indukovanou reaktivními sloučeninami kyslíku (ROS), hlavně  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Snižuje aktivitu kinázy Ask1, je-li dostupný nádorovým buňkám vystaveným účinku  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ask1 patří do rodiny MAP kináz a aktivuje další proteinkinázy (například Sek1), které vedou ke vzniku apoptózy v buňkách fibrosarkomu HT1080.

Seleničitan navozuje PI3 kinázovou/Akt dráhu v buňkách HT1080, které byly vystaveny stresu ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tato dráha zabraňuje apoptóze, aktivuje Bcl-2. To je regulační protein z Bcl rodiny, který reguluje propustnost vnější mitochondriální membrány (zabraňuje vylití cytochromu c).

Seleničitan taky blokuje kaspázu-9, což je jedna z nejdůležitějších apoptotických kaspáz. Tato kaspáza spouští kaskádovou reakci, která aktivuje CAD DNázu a tím degradaci DNA. (Sang-Oh Yoon et al. 2001)

Vysoké koncentrace selenosloučenin významně ovlivňují nádorové buňky, a to tím, že u nich naopak indukují apoptózu. Touto problematikou se budu zabývat v kapitole 3.1 Sloučeniny selenu indukující apoptózu u nádorových buněk.



obr. 6 Vliv seleničitanu a peroxidu vodíku na mitochondriální membránový potenciál

Buňky byly inkubovány v nepřítomnosti (A) a přítomnosti (B)  $2 \mu\text{M}$  seleničitanu po dobu 12 hodin a v přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200$  nebo  $400 \mu\text{M}$ ) byly inkubovány dalších 24 hodin. Byl měřen membránový potenciál. Z obrázku je zřetelné, že seleničitan pomáhá udržet správný membránový potenciál. Grafy ukazují výsledky 3 různých pokusů. (Sang-Oh Yoon et al. 2001)

## 2.4 Selen a imunitní systém

Selenoproteiny ovlivňují genovou expresi proteinů extracelulární matrix a jsou důležité pro migraci makrofágů. U myši s delecí genu pro tRNA[Ser]Sec byla zvýšená exprese genů pro komponenty extracelulární matrix - Col1 $\alpha$ 1, Col5 $\alpha$ 2, Bgn (biglykan), Ctgf (růstový faktor pojivové tkáně) a Spart (kyselý sekretovaný protein bohatý na cystein). Také se zvýšila exprese genů pro inhibitory proteolýzy EM – Timp3 (tkáňový inhibitor metalloproteináz), Serpinh1 (inhibitor serinové peptidázy). Tím byla omezena remodelace EM a znemožněna efektivní migrace makrofágů do místa zánětu. (Carlson et al. 2009)

Nedostatek selenu ovlivňuje různé typy buněk imunitního systému. Makrofágy při nedostatku selenu mají sníženou schopnost syntetizovat leukotrien B4, který je důležitý pro chemotaxi. Lymfocyty s nedostatkem selenu mají sníženou schopnost proliferace při odpovědi na antigen. Neutrofilové se sníženou hladinou selenu méně efektivně zabíjí mikroby a naopak jsou samy poškozeny kyslíkovými radikály. (Arthur et al. 2003)

Snížená aktivita GPx a možná i TrxR může ovlivňovat metabolismus eikosanoidů a tak způsobit formování zánětu a produkci chemotaktických sloučenin. Tyto sloučeniny mohou způsobit větší náchylnost buněk ke vzniku rakoviny. (Arthur et al. 2003)

## 3. Selen a jeho role v prevenci a léčbě rakoviny

Sloučeniny selenu ve fyziologických koncentracích chrání buňky před oxidativním stresem a zabraňují apoptóze. Vysoké koncentrace sloučenin selenu jsou pro buňky toxické a této skutečnosti je využíváno pro léčbu rakoviny. Například inhibují proliferaci nádorových buněk, podporují indukci apoptózy, ovlivňují funkci p53 a dalších tumor-supresorových proteinů, ovlivňují expresi a aktivitu proteinů regulujících buněčný cyklus, signalizačních molekul, proteáz, transkripčních faktorů a proteinů asociovaných s mitochondriemi. Při prevenci a léčbě rakoviny záleží na konkrétní sloučenině a její koncentraci. (Sinha, El-Bayoumy 2004)

### 3.1 Sloučeniny selenu indukující apoptózu u nádorových buněk

Seleničitan sodný indukuje apoptózu u nádorových buněk. Tato skutečnost byla zkoumána u lidských HeLa buněk rakoviny děložního čípku. Ukázalo se, že koncentrace menší než 10  $\mu$ mol/l nemá významný vliv. Pro pokus byla použita koncentrace 40  $\mu$ mol/l .



Buňky, kterým byl dodáván seleničitan sodný po dobu 24 hodin vykazovaly zvýšenou hladinu ROS, snížení membránového potenciálu u mitochondrií a snížení exprese antioxidantních proteinů. Všechny tyto procesy podporují apoptózu. Také byla prokázána negativní regulace Bcl-2 u nádorových buněk vystavených seleničitanu sodnému. Mezi další negativně regulované proteiny patří např. superoxid dismutáza (antioxidační enzym, který přeměňuje superoxidový anion na peroxid vodíku), peroxiredoxiny (proteiny redukující peroxidy), translační elongační faktor eEF2, ubiquitin (značí proteiny určené k degradaci) nebo D-dopachrom tautomeráza (účastní se biosyntézy melaninu, což je antioxidant). Seleničitan sodný snižuje membránový potenciál mitochondrií a tím způsobuje vylití cytochromu c, aktivaci p53-dráhy a následnou apoptózu. Seleničitan sodný také způsobuje zastavení buněk ve fázi G1 buněčného cyklu. Způsobuje také degradaci DNA, pozitivně reguluje receptor DR5 (receptor pro tumor-nekrózový faktor TNF- $\alpha$ , který indukuje apoptózu) v DU145 buňkách a indukuje kaspázu-8. (Sinha, El-Bayoumy 2004 a Liping Fu et al. 2011)

Selenomethionin je méně efektivní než seleničitan v indukci apoptózy u nádorových buněk. Pokus byl proveden na nádorových buňkách prostaty LNCaP (exprimují p53) a PC3 (neexprimují p53). Ukázalo se, že selenomethionin vyvolává apoptózu pouze v přítomnosti methioninázy, která štěpí selenomethionin na reaktivní metabolity. Metabolity selenomethioninu (například methylselenol) generují superoxid z dalších sloučenin selenu za přítomnosti GSH. Superoxid je esenciální pro apoptózu indukovanou selenomethioninem. Aktivuje p53 a podmiňuje jeho translokaci do mitochondrií. Tam způsobí pokles membránového potenciálu. Apoptóza indukovaná selenomethioninem je tedy závislá na p53. To potvrzuje i snížená citlivost PC3 buněk vůči selenomethioninu a methionináze. (Zhao et al. 2006)

Seleničitan sodný selektivně indukuje apoptózu u nádorových buněk prostaty. Byla porovnávaná citlivost k apoptóze indukované seleničitanem u tří dvojic buněčných kultur. Každá dvojice byla odebrána od jednoho jedince a tvořily ji nádorové buňky adenokarcinomu prostaty a normální buňky prostaty. Koncentrace 25 – 100  $\mu\text{M}$  seleničitanu sodného snižuje hladinu protiapoptotického proteinu Bcl-2 u nádorových buněk. U dvou případů ze tří byla vlivem seleničitanu zvýšená hladina proapoptotického proteinu Bax u nádorových buněk. Nádorové buňky jsou citlivější k apoptóze indukované seleničitanem sodným také proto, že mají nižší hladinu mangan dependentní superoxid dismutázy (MnSOD). Při metabolismu seleničitanu totiž vzniká superoxid, který způsobuje oxidativní stres. MnSOD je antioxidační protein měnící superoxid na peroxid vodíku. (Husbeck et al. 2006)



### 3.2 Selenosloučeniny, poškození a opravy DNA

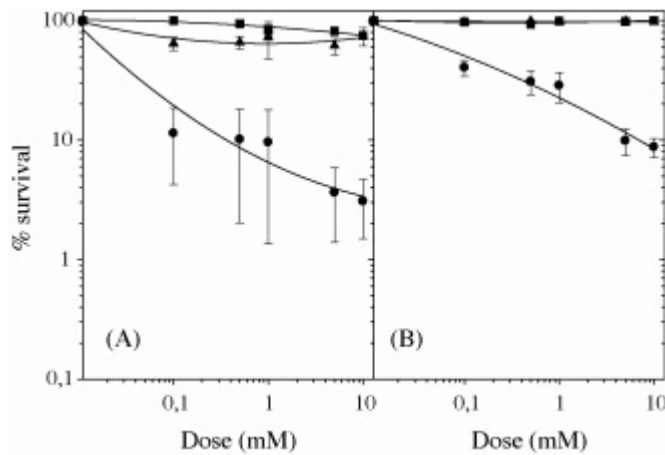
Selenomethionin (SeMet) indukuje opravu DNA u lidských fibroblastů a chrání buňky proti poškození DNA způsobené UV-zářením. Pro pokus byla použita koncentrace 10  $\mu\text{M}$ . Pro tuto koncentraci byla pozorována snížená distribuce mutací způsobujících nádorové bujení. Naopak 10  $\mu\text{M}$  je tak nízká koncentrace, že neovlivňuje buněčný cyklus ani nevyvolává apoptózu.

Selenomethionin působí na proteiny, které se účastní opravy DNA. Podporuje navázání PCNA (buněčný jaderný proliferační antigen) na místa poškození DNA. S PCNA interagují opravné proteiny, například pol- $\epsilon$  polymeráza, která je pro opravu poškození DNA esenciální. SeMet také snižuje četnost mutací způsobených oxidativním stresem. (Seo et al. 2002)

Existuje i další dráha, vedoucí k opravě DNA. Tato dráha je závislá na p53, který je aktivován sloučeninami selenu, konkrétně selenomethioninem (SeMet), seleničitanem sodným ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) a kyselinou methylselenovou (MSA). SeMet aktivuje p53 redukcí jeho cysteinových zbytků,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  indukuje fosforylaci serinových zbytků a MSA indukuje fosforylaci threoninových zbytků. Protein p53 pozitivně reguluje expresi genů pro proteiny XPC, XPE, p48XPE a Gadd45a, které se účastní excizních nukleotidových reparací (NER). (Smith et al. 2004)

SeMet a MSA aktivují Ref1 (redoxní faktor), který aktivuje p53 díky redukcí jeho cysteinů. Ref1 se účastní opravy DNA i nezávisle na p53. Endonukleázová podjednotka redoxního faktoru (APE) je nezbytná pro excizní reparaci bazí (BER). Pro pokus byla použita koncentrace 10-20  $\mu\text{M}$  SeMet a 1-5  $\mu\text{M}$  MSA a  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . (Smith et al. 2004)

Ve vyšších koncentracích (0,1 – 10 mM, viz obr. 8) můžou sloučeniny selenu způsobovat poškození DNA. Tato skutečnost byla prokázána u seleničitanu sodného, který byl podáván kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*. Seleničitan sodný generuje zlomy na obou vláknech v dvojšroubovici DNA. Také způsobuje posunové mutace, většinou delece 1-4 párů bazí. Navíc produkuje superoxid, který způsobuje další mutace. (Letavayová et al. 2008)



Obr. 8 Přežívání kvasinek po podávání sloučenin selenu (Letavayová et al. 2008)

Přežití kvasinek po podávání seleničitanu sodného (•), selenomethioninu (◼) a selenomethylselenocysteinu (trojúhelník) v exponenciální (A) a stacionární (B) fázi růstu buněk.

### 3.3 Thioredoxin reduktáza v nádorových buňkách

Jeden z nejvíce probádaných selenoproteinů, thioredoxin reduktáza, má v nádorových buňkách mnoho pozitivních funkcí. Patří mezi ně například ochrana proti oxidativnímu stresu či podpora syntézy DNA. Nádorové buňky exprimují mnohonásobně vyšší množství TrxR než buňky normální. Některé nádorové buňky mohou navíc sekretovat redukovaný thioredoxin, který funguje jako autokrinní růstový faktor. Byly proto vyvinuty léky, které inhibují TrxR v nádorových buňkách a tím zastavují jejich proliferaci a růst nádoru. Inhibice TrxR současně mění redoxní podmínky v buňce, což může vést k apoptóze. Mezi inhibitory TrxR patří například sloučeniny platiny, jako cisplatina. Ta má ale mnoho nežádoucích účinků, a proto je více používána jiná sloučenina platiny – 2,2':6',2"-terpyridinplatina. Ta inhibuje TrxR reverzibilně i ireverzibilně. Tento efekt byl prokázán u glioblastomů a ovariálních sarkomů. (Becker et al. 2001)

Mezi další inhibitory TrxR patří oxid arsenitý  $As_2O_3$  (ATO), který ireverzibilně váže TrxR a tím ji inhibuje. Tato skutečnost byla potvrzena u buněk MCF-7 rakoviny prsu. (Jun Lu et al. 2007)

### 3.4 Sloučeniny selenu a metastáze

Podávání methylselenocysteinu a seleničitanu sodného (1 a 3  $\mu$ M) buňkám LMCap (buňky rakoviny prostaty) a PNT1A (nenádorové buňky prostaty) ovlivňuje expresi velkého množství genů. Podávání methylselenocysteinu nejvíce ovlivnilo geny kódující kolagen. Došlo ke snížení exprese COL1A1 (gen kódující kolagen typu 1 $\alpha$ 1) a COL1A2 (gen kódující kolagen typu 1 $\alpha$ 2) vlivem podávání methylselenocysteinu. Tyto dva proteiny

se vyskytují ve velkém množství v rakovinných buňkách (rakovina prostaty, varlat a ledvin) a zvyšují riziko metastáz. U testovaných nádorových buněk byla naopak zvýšená exprese COL4A5 (gen kódující kolagen typu IV). Kolagen typu IV je součástí laminy a zajišťuje buňkám oporu. Zvýšením hladiny kolagenu typu IV došlo ke změně uspořádání extracelulární matrix a tím k ochraně proti proliferaci rakovinných buněk a vzniku metastáz. Methylselenocystein také zvýšil expresi COL6A1 (gen kódující kolagen typu VI) u nádorových buněk. Kolagen typu VI patří mezi hlavní komponenty extracelulární matrix. Váže buňky a další typy kolagenu (I, IV). Za normálních podmínek je v rakovinných buňkách jeho hladina snížena. (Hurst et al. 2008)

Vliv seleničitanu sodného na expresi genů pro kolagen nebyl prokázán. Seleničitan sodný ale negativně reguluje expresi genů pro metalloproteinázy (MMP-2, MMP-9). Tyto proteiny interagují s kolagenem a štěpí ho. Kolagen je tedy štěpen méně, což zabraňuje šíření metastáz. (Hurst et al. 2008)

Seleničitan sodný (koncentrace 50  $\mu\text{M}$ ) zabraňuje metastazování kožního melanomu. Zastavuje buněčný cyklus v G0/G1 fázi u buněk B16F10 (buňky melanomu u myši) in vitro. Nebylo prokázáno zastavení růstu melanomu in vivo, ale nedocházelo ke vzniku metastáz. Vlivem seleničitanu sodného (koncentrace 40  $\mu\text{M}$ ) došlo ke snížení exprese genů pro p53, Cdk2 (cyklin dependentní kináza) a Cdk4. Exprese genu pro p21/Waf1 (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1) byla naopak zvýšena. Metastazování je tedy redukováno díky indukci apoptózy, která je nezávislá na p53. Hlavní příčinou apoptózy je zastavení buněčného cyklu v G0/G1 fázi díky p21/Waf, který inhibuje Cdk1. (Song et al. 2009)

### 3.5 Selen a inhibice angiogeneze u nádorových buněk

Angiogeneze je esenciální proces pro vznik, vývoj a růst nádoru. Vznik nových cév je důležitý pro výživu nádorových buněk. Selenosloučeniny mohou tento proces inhibovat. Pokus byl prováděn na myších s rakovinou mléčné žlázy, krměných po dobu 7 týdnů česnekem obohaceným o selen. U myši byl pozorován výrazný pokles cév v nádorech (o 34%). U normálních buněk úbytek cév v mléčné žláze nebyl pozorován. U myši s nádorem byla navíc prokázána snížená hladina VEGF (růstový faktor pro cévní endoteliální buňky), což je esenciální růstový faktor pro vývoj cév. (Jiang et al. 1999)

Další část pokusu byla věnována buněčné kultuře lidských endoteliálních buněk (HUVEC). Podávání 6 $\mu\text{M}$  MSA způsobilo inhibici matrixové metalloproteinázy (MMP-2), která je sekretována endoteliálními buňkami a je důležitá pro vytvoření prostoru pro

proliferaci endoteliálních buněk a formování nových cév. Dlouhodobé podávání MSA způsobuje u buněk apoptózu. (Jiang et al. 1999). Ukázalo se, že MSA není přímý inhibitor MMP-2. Jejím specifickým inhibitorem je methylselenol. (Lu 2000)

Pro inhibici angiogeneze jsou také důležité selenoproteiny. Thioredoxin reduktáza negativně reguluje hladinu VEGF a receptorů pro VEGF, hlavně VEGF-R2 v cévních endoteliálních buňkách v nádorech mléčné žlázy. Nedostatek selenu (a tím nedostatek TrxR) zvyšuje expresi genů pro tyto proteiny, což je další důvod, proč je TrxR důležitá v prevenci rakoviny. (Streicher et al. 2004)

## 4. Klinické testy

Bylo provedeno mnoho klinických testů s různými sloučeninami selenu a potravinami obohacenými o selen. Také typ rakoviny se v jednotlivých testech liší, proto není snadné jednotlivé testy porovnávat. Většina těchto testů však potvrdila pozitivní vliv selenu, a to hlavně na prevenci rakoviny.

### 4.1 Vliv selenu na rakovinu prostaty (NPC a SELECT)

Pokusu NPC se zúčastnilo 1312 lidí z USA, konkrétně z oblastí, ve kterých jsou půdy chudé na selen. Přibližně tři čtvrtiny respondentů tvořili muži. Všichni účastníci prodělali buď nejméně dvakrát karcinom bazálních buněk (BCC) anebo alespoň jednou karcinom šupinatých buněk (SSC). Respondentům bylo podáváno 200 µg kvasinek obohacených o selen za den a primárně byl zkoumán vliv selenu na rakovinu kůže. Průměrná doba podávání selenu byla 6,4 let. Průměrný věk u Se skupiny byl 64,9 let a u kontrolní skupiny 63,7 let. Kontrolní skupina užívala placebo. Vliv na rakovinu kůže nebyl prokázán, byl však publikován výrazný vliv selenu na jiné typy rakoviny, konkrétně na rakovinu prostaty, plic a střeva. Ukázalo se, že podávání selenu redukuje výskyt těchto typů rakoviny a navíc redukuje celkový výskyt rakoviny. Skupina, které byl podáván selen, vykazuje nižší úmrtnost na rakovinu. Počet nových případů rakoviny u skupiny, které byl podáván selen, byl 105 ve srovnání se 137 novými případy v placebo skupině. Počet úmrtí na rakovinu v Se skupině byl 40 a v placebo skupině bylo zaznamenáno 66 úmrtí. Bylo také pozorováno snížení výskytu dalších typů rakoviny, například rakoviny štítné žlázy, slinivky a ledvin. Naopak se prokázalo zvýšení výskytu rakoviny močového měchýře a prsu. U těchto typů rakoviny však nebyl dostatečný počet případů, výsledky jsou proto statisticky málo spolehlivé. Bylo zjištěno, že nejvýraznější vliv má podávání selenu na

skupinu s nejnižší počáteční hladinou selenu v plazmě (<106,4 ng/ml). Redukce výskytu rakoviny prostaty u této skupiny byla až o 49%. (Duffield-Lillico et al. 2002)

Výskyt různých druhů rakoviny u Se a placebo skupiny								
rakovina	počet případů		neupravené hodnoty			upravené hodnoty		
	Se	placebo	RR	95% CI	P	HR	95% CI	P
celkem	105	137	0,75	0,58-0,98	0,03	0,75	0,58-0,97	0,03
prostaty	22	42	0,51	0,29-0,87	0,009	0,48	0,28-0,80	0,005
plic	25	35	0,7	0,40-1,21	0,18	0,74	0,44-1,24	0,26
střeva	9	19	0,46	0,19-1,08	0,055	0,46	0,21-1,02	0,057
další karcinomy	6	9	0,66	0,19-2,07	0,44	0,67	0,24-1,88	0,44
nekarcinomy	3	5	0,59	0,09-3,04	0,5	0,59	0,14-2,47	0,47
jícnu	2	5	0,39	0,04-2,41	0,28	0,4	0,08-2,07	0,28
melanomy	11	9	1,21	0,46-3,30	0,68	1,18	0,49-2,85	0,71
moč. měchýře	10	8	1,24	0,44-3,61	0,66	1,28	0,50-3,25	0,6
prsu	11	6	1,82	0,62-6,01	0,24	1,89	0,69-5,14	0,21
hlavy a krku	9	7	1,27	0,42-4,01	0,65	1,27	0,47-3,42	0,63
lymfomy a leukémie	8	6	1,32	0,40-4,61	0,62	1,25	0,43-3,61	0,68
úmrtnost	40	66	0,59	0,39-0,89	0,008	0,59	0,39-0,87	0,008

Tab. 2 NPC – Výskyt různých druhů rakoviny u Se a placebo skupiny (Duffield – Lillico et al. 2002)

RR – relativní riziko. RR = poměr pravděpodobnosti propuknutí nemoci u Se skupiny a pravděpodobnosti propuknutí nemoci v placebo skupině (pravděpodobnost propuknutí nemoci je podíl počtu lidí, u kterých nemoc propukla a celkového počtu lidí)

95% CI – interval spolehlivosti. 95% CI = indikátor spolehlivosti výsledků. Z 95% se výsledek pohybuje v daném intervalu.

P – pravděpodobnost, že výsledky jsou více ovlivněny jinými faktory než podáváním selenu a rozdíl mezi Se a placebo skupinou je způsoben náhodným výběrem vzorku populace

HR – relativní riziko, které zanedbává rozdíly mezi respondenty (věk, kulturní rozdíly, kouření) (platí pro všechny upravené hodnoty)

Další pokus se zabýval vlivem koncentrace selenu v séru na riziko vzniku rakoviny prostaty. Pokusu se účastnilo 212 respondentů, kterým byl diagnostikován nádor prostaty, a 233 kontrol ve věku od 40 do 79 let. Pokus byl prováděn v USA a respondenti byli přibližně z poloviny běloši a z poloviny černoši. Ukázalo se, že koncentrace selenu v séru nad 0,135 µg/ml snižuje riziko vzniku rakoviny prostaty. Bylo také zjištěno, že čím vyšší koncentrace Se v séru, tím menší riziko vzniku rakoviny prostaty. (Vogt et al. 2003)

Pokus, který měl potvrdit vliv selenu na rakoviny prostaty, se jmenuje SELECT (selenium and vitamin E cancer prevention trial). Účastnilo se ho celkem 32 400 mužů z USA, Kanady a Portorika ve věku nad 50 let pro Afroameričany a nad 55 let pro ostatní. Respondentům bylo podáváno 200 $\mu$ g selenu (L-selenomethionin) a 400 IU<sup>1</sup> vitamínu E ( $\alpha$ -tokoferylacetát), což odpovídá množství 400 mg za den po dobu 7-12 let. Respondenti byli rozděleni do 4 skupin – ti, kterým byl podáván pouze selen, pouze vitamin E, selen i vitamin E a ti, kteří užívali placebo. (Lippman et al. 2005)

Statisticky významný rozdíl v počtu nových případů mezi těmito 4 skupinami (selen – 432, vitamin E – 473, selen a vitamin E – 437, placebo – 416) nebyl pozorován. Z dat je zřejmé, že počet nových případů je mírně vyšší u skupiny, které byl podáván samostatně vitamin E. Také počet úmrtí se mezi skupinami výrazně neliší (selen – 378, vitamin E – 358, selen a vitamin E – 359, placebo – 382). (Lippman et al. 2009)

Rozdílné výsledky pokusů NPC a SELECT lze přičíst mnoha faktorům. SELECTu se účastnil mnohem vyšší počet respondentů, tudíž by jeho výsledky měly být statisticky přesnější. V SELECTU je však použit L-selenomethionin, což je málo reaktivní organická sloučenina. Není ale známo, že by kvasinky obohacené o selen obsahovaly reaktivnější sloučeniny. Dalším faktorem může být, že pokus NPC byl zaměřen na respondenty s počáteční nízkou hladinou selenu v krevní plazmě. Pokus SELECT počáteční hladiny selenu v krevní plazmě nevzal v úvahu. Účastníci pokusu SELECT jsou zdraví muži, naproti tomu pokusu NPC se účastnili respondenti, kteří alespoň jednou prodělali rakovinu kůže. SELECT byl navíc zaměřen pouze na rakovinu prostaty a nebral v úvahu ostatní typy rakoviny.

## 4.2 Antioxidační ochrana a prevence rakoviny (Linxianský test a SU.VI.MAX)

Linxianský test byl prováděn v Číně v provincii Linxian, což je oblast vysokého výskytu rakoviny jícnu a žaludku. Lidé v této oblasti mají velmi nízký příjem většiny důležitých živin, včetně selenu. Pokusu se zúčastnilo 29584 respondentů ve věku 40-69 let. Celkový počet úmrtí během pokusu byl 2127, z čehož 32% následkem rakoviny, hlavně jícnu a žaludku. Respondentům byly podávány různé výživové doplňky po dobu průměrně 5,25 let a ukázalo se, že podávání kombinace 15 mg  $\beta$ -karotenu, 50  $\mu$ g kvasinek obohacených o selen a 30 mg  $\alpha$ -tokoferolu výrazně redukuje úmrtnost na rakovinu. (Blot et al. 1995)

---

<sup>1</sup> Mezinárodní jednotka, která bere v úvahu i biologický účinek dané látky. 1 IU vitamínu E odpovídá 1 mg  $\alpha$ -tokoferylacetátu.



Další pokus zkoumající účinky antioxidantů na výskyt rakoviny se jmenuje SU.VI.MAX. Účastnilo se ho 12741 respondentů z Francie, z toho bylo 7713 žen ve věku 35-60 let a 5028 mužů ve věku 45-60 let. Respondentům byly podávána kombinace těchto antioxidantů: 120 mg kyseliny askorbové, 30 mg vitamínu E, 6 mg  $\beta$ -karotenu, 100  $\mu$ g selenu (kvasinky obohacené o selen) a 20 mg zinku každý den po dobu 7,5 let. Celkově nebyl pozorován výrazný rozdíl v incidenci rakoviny. Bylo pozorováno 562 nových případů rakoviny, z toho 267 u skupiny s antioxidanty a 295 u placebo skupiny. Nebyl pozorován ani rozdíl v celkové mortalitě mezi skupinami. Bylo však prokázáno, že podávané antioxidanty snižují výskyt rakoviny u mužů a ne u žen. (Hercberg et al. 2004)

Linxianský test byl prováděn u respondentů s nízkým příjmem selenu. Podávání selenu je tedy neefektivnější u lidí s nízkým příjmem selenu. Oba tyto testy zahrnují kromě selenu i další antioxidanty, což mohlo výsledky ovlivnit. Jejich zařazení do testů vyplývá z předpokladu, že ROS zvyšují riziko vzniku rakoviny. SU.VI.MAX prokázal preventivní vliv selenu u mužů nejspíš proto, že muži mají nižší hladinu antioxidantů.

#### 4.3 Vliv hladiny selenu na riziko vzniku rakoviny (NLCS)

Nizozemské kohortní studie se zúčastnilo 120852 respondentů ve věku od 55 do 69 let. Hlavním cílem bylo zjistit souvislost mezi hladinou selenu v nehtech na nohou a rizikem vzniku rakoviny. Hladina selenu v nehtech na nohou je dlouhodobý indikátor příjmu selenu. Předpokládalo se, že čím nižší hladina selenu v nehtech na nohou, tím vyšší riziko vzniku rakoviny. Zkoumány byly tři typy nádorů – karcinom šupinatých buněk jícnu (ESCC), adenokarcinom jícnu (EAC) a adenokarcinom žaludečního česla (GCA). Byl také zkoumán vliv kouření, příjmu dalších antioxidantů (vitamin C, vitamin E a karotenoidy) a BMI. Za dobu 16,3 let se objevilo 64 nových případů ESCC, 112 EAC a 114 GCA. Byla zjištěna souvislost mezi hladinou selenu a rizikem vzniku ESCC. Čím vyšší hladina selenu v nehtech, tím nižší riziko vzniku rakoviny. Hladina selenu stejným způsobem ovlivňuje riziko vzniku GCA, výrazněji však u žen. Vliv hladiny selenu na riziko vzniku EAC byl zjištěn pouze u žen a nekuřáků. Čím vyšší měli hladinu selenu v nehtech, tím nižší bylo riziko vzniku rakoviny. (Steevens et al. 2009)

Se v nehtech (µg/g)	počet respondentů	ESCC			EAC			GCA		
		počet případů	RR	95% CI	počet případů	RR	95% CI	počet případů	RR	95% CI
1. ≤0,498	7207	33	1		33	1		41	1	
2. ≤0,552	7614	10	0,30	0,14 - 0,61	35	1,15	0,70 - 1,89	27	0,73	0,44 - 1,21
3. ≤0,613	7705	12	0,37	0,19 - 0,73	24	0,85	0,49 - 1,48	31	0,90	0,55 - 1,49
4. >0,613	7584	9	0,28	0,13 - 0,59	20	0,74	0,41 - 1,32	15	0,46	0,25 - 0,85
			P	0,001		P	0,20		P	0,04
Skupina respondentů										
celkem	30110	64	0,72	0,61–0,85	112	1,03	0,94–1,12	114	0,88	0,79–0,98
muži	14207	40	0,81	0,64–1,04	93	1,07	0,99–1,15	97	0,94	0,84–1,06
ženy	15903	24	0,79	0,63–0,99	19	0,72	0,61–0,84	17	0,73	0,56–0,95
			P	0,81		P	<0,001		P	0,12
Status kouření										
nekuřáci	11745	11	0,73	0,53–0,99	19	0,74	0,64–0,86	15	0,69	0,52–0,90
bývalí kuřáci	10906	21	0,72	0,53–0,97	61	1,07	0,99–1,15	57	0,88	0,73–1,06
kuřáci	7459	32	0,92	0,71–1,19	32	1,18	0,84–1,65	42	1,1	0,91–1,33
			P	0,84		P	<0,001		P	0,07

Tab. 3 NLCS – Vliv hladiny selenu v nehtech na nohou na riziko vzniku rakoviny.

RR – relativní riziko, v první části tabulky podíl pravděpodobnosti vzniku rakoviny u čtvrtiny respondentů s nejnižší hladinou Se v nehtech ku pravděpodobnosti vzniku rakoviny u dalších čtvrtin. Ve druhé a třetí části tabulky pravděpodobnost vzniku rakoviny u čtvrtiny s nejnižší hladinou Se ku pravděpodobnosti u čtvrtiny s nejvyšší hladinou Se. Hodnoty upraveny, zanedbávají rozdíly ve věku, pohlaví, statusu kouření, konzumaci alkoholu a BMI. (Tabulka je upravená, hodnoty převzaty od Steevens et al. 2009)

Nizozemská kohortní studie také zkoumala vliv hladiny selenu v nehtech na nohou na riziko vzniku rakoviny prostaty. Během studie se objevilo 540 nových případů rakoviny prostaty. Bylo zjištěno, že nízké hladiny selenu souvisí se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny prostaty (RR 0,69, 95% CI : 0,48 – 0,99). Nejvýraznější je tato korelace u bývalých kuřáků. Bylo také zjištěno, že muži s nízkou hladinou selenu v kombinaci s

nízkým příjmem antioxidantů (konkrétně vitamin C a  $\beta$ -kryptoxanthin) mají zvýšené riziko vzniku rakoviny prostaty. (van der Brandt et al. 2003)

Stejná studie zkoumala i vliv na rakovinu močového měchýře. Během studie se objevilo 431 nových případů rakoviny močového měchýře. Nízká hladina selenu v nehtech na nohou zvyšuje riziko vzniku rakoviny močového měchýře (RR 0,67, 95% CI : 0,46 – 0,97). Nejvýrazněji je tato skutečnost prokázána u bývalých kuřáků a největší vliv má hladina selenu na invazivní karcinomy močového měchýře. Narozdíl od rakoviny prostaty nebyl prokázán vliv příjmu antioxidantů na riziko vzniku rakoviny močového měchýře. (Zeegers et al. 2002)

Nejvyšší riziko vzniku rakoviny mají lidé s nízkými hladinami selenu v organismu. Hladina selenu v nehtech na nohou je dlouhodobý indikátor příjmu selenu. Nizozemská kohortní studie tedy potvrzuje poznatek, že lidé s nízkým příjmem selenu mají nejvyšší riziko vzniku rakoviny. Podávání selenu je tedy nejefektivnější právě u nich.

#### 4.4 Ideální klinický test

Ideálního klinického testu, zkoumajícího vliv selenu na prevenci rakoviny, by se mělo účastnit co největší množství respondentů. Výsledky jsou potom statisticky spolehlivější. Navíc by mohl být zkoumán vliv selenu na více typů rakoviny, obzvláště těch neobvyklých. Respondenti by měli být rozděleni na dvě skupiny. Jedné je podáván selen a druhé placebo. Měla by být použita sloučenina selenu, u které byl již dříve prokázán efekt na prevenci rakoviny.

Doba testování by měla být co nejdelší, aby byl prokázán vliv selenu v dlouhodobém měřítku. Na začátku testování by měla být respondentům změřena hladina selenu v krvi (krátkodobý indikátor) a v nehtech na nohou (dlouhodobý indikátor). Tyto hladiny by měly být měřeny po celou dobu testování.

Pokud chceme prokázat vliv selenu, neměly by být respondentům cíleně podávány další antioxidanty a jejich stravovací návyky by měly být kontrolovány. Respondenti by měli být rozděleni do skupin zohledňujících příjem antioxidantů, status kouření a případně další faktory, které by mohly mít vliv na rakovinu.

## 5. Závěr

Na základě výsledků klinických testů se ukázalo, že selen je důležitý v prevenci rakoviny. Podávání selenu lidem s nízkým příjmem selenu výrazně snižuje riziko vzniku rakoviny. Tento fakt byl prokázán jen u některých typů rakoviny (rakovina prostaty, nádory trávicí soustavy a močového měchýře). Nejspíš proto, že tyto nádory jsou nejvíce asociovány s oxidativním stresem. V některých studiích byly podávány i další antioxidanty, což potvrzuje roli antioxidantů v prevenci rakoviny.

Podávání selenu lidem, kteří mají normální či vysoký příjem selenu a tedy vysoké koncentrace selenu v plazmě, nesnižuje riziko vzniku rakoviny. U těchto lidí by mohl selen způsobit zdravotní potíže, protože příjem selenu nad 400  $\mu\text{g}$ / den může být pro člověka toxický.

Nejdůležitější roli v prevenci rakoviny hrají selenoproteiny glutathion peroxidáza a thioredoxin reduktáza, které chrání buňky před oxidativním stresem. V prevenci rakoviny se také uplatňují nízkomolekulární sloučeniny, například seleničitan, což je regulátor apoptózy.

Sloučeniny selenu jsou perspektivní pro léčbu rakoviny. Toxicita selenu je využívána pro terapii nádorů. Selen je však toxický i pro normální buňky, což může způsobit vedlejší účinky. Zvýšená citlivost ke sloučeninám selenu byla prokázána jen u některých typů nádorových buněk. Použité selenosloučeniny se v jednotlivých klinických testech liší, nejefektivnější jsou anorganické sloučeniny, zejména seleničitan sodný, protože jsou více reaktivní.

Využití selenu k léčbě rakoviny vyžaduje další zkoumání, je důležité zjistit správnou koncentraci a nejefektivnější sloučeniny, které budou vykazovat co nejméně nežádoucích účinků. Více pozornosti by také mělo být věnováno výzkumu molekulárních mechanismů, aby bylo zjištěno, jak přesně selenosloučeniny v těle fungují.

## Seznam použité literatury

- Artur J.R., McKenzie R.C., Beckett G.J.** (2003) Selenium in the immune system, *J Nutr* 133(5): 14575 - 14595 (review)
- Becker K., Herold-Mende C., Park J.J., Lowe G., Heiner Schirmer R.** (2001) Human Thioredoxin reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2''-Terpyridine) platinum(II) Complexes. Possible implications for a novel intitumor strategy, *J Med Chem* 44(17): 2784 - 2792
- Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Reed Larsen P.** (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases, *Endocrine reviews* 23(1): 38 - 89 (review)
- Blankenberg S., Rupprecht H.J., Bickel C., Torzewski M., Hafner G., et al.** (2003) Glutathion peroxidase activity and cardiovascular events in patients with coronary atreny disease, *N Engl J Med* 349: 1605 - 1613
- Blot W.J., Li Jun-Yao, Taylor P.R. Guo W., Dawsey S.M., Li B.** (1995) The Linxian trials : mortality rates by vitamin-mineral intervention group, *Am J Clin Nutr* 62(6 Suppl): 1424S - 1426S
- Brigelius-Flohé R.** (1999) Tissue specific functions of individual glutathion peroxidases, *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 951 - 965 (review)
- Burk R.F., Hill K.E.** (2009) Selenoprotein P – expression, function and roles in mammals, *Biochim Biophys Acta* 1790(11): 1441 - 1447
- Carlson B.E., Yoo Min-Hyuk, Sano Y., Sengupta A., Kim J.Y. et al.** (2009) Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracelullar matrix-related gene expression, *BMC Immunology* 10: 57
- Collins R., Johansson A.L., Karlberg T., Markova N., van den Berg S., et al.** (2012) Biochemical discrimination between Selenium and Sulfur 1: A single residue provides selenium specifiky to human selenocystein lyase, *PLoS ONE* 7(1): e30581. doi:10.1371/journal.pone.0030581
- Combs Gerald F.** (2001) Selenium in global food systems, *British Journal of Nutrition* 85: 517 - 547
- Drake E.N.** (2006) Cancer chemoprevention : selenium as a prooxidant, not an antioxidant, *Med Hypotheses* 67(2): 318 - 322
- Drasch G., Mailänder S., Schlosser C., Roider G.** (2000) Content of non-mercury-associated selenium in human tissues, *Biological Trace Element Research* 77(3): 219 - 230
- Duffield-Lillico A., Reid M.E., Turnbull B.W., Combs G.F., Slate E.H. et al.** (2002) Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial : a summary report of a Nutritional Prevention of Cancer trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(7): 630 - 639
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M.** (2008) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : GLOBOCAN 2008, *International Journal of Cancer* 127(12): 2893 - 2917
- Fordyce F.** (2005) Selenium deficiency and toxicity in the environment, *Essentials of medical geology*, chapter 15: 373 - 415
- Furnsinn C., Englisch R., Ebner K., Nowotny P., Vogle C., Waldhausl W.** (1996) Insulin-like vs non-insulin stimulation of glukose metabolism by vanadium, tungsten and selenium compounds in rat muscle, *Life Sci* 59(23): 1989 - 2000
- Hercberg S., Galan P., Preziosi P., Bertrais S., Mennen L. et al.** (2004) The SU.VI.MAX study : A randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals, *Arch Intern Med* 164(21): 2335 - 2342

- Hipler U.C., Wollina U., Denning D., Hipler B.** (2002) Fluorescence analysis of reactive oxygen species (ROS) generated by six isolates of *Aspergillus fumigatus*, Proceedings of the 11th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific, 411 - 414
- Holmgren A.** (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems, *J Biol Chem* 264: 13963 - 13966 (review)
- Horibata Y., Hirabayashi Y.** (2006) Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1, *J Lipid Res* 48(3): 503 - 508
- Hurst R., Elliott R.M., Goldson A.J., Fairweather-Tait S.J.** (2008) S-methylselenocysteine alters collagen gene and protein expression in human prostate cells, *Cancer Lett* 269(1): 117 - 126
- Husbeck B., Nonn L., Peehl D.M., Knox S.J.** (2006) Tumor-selective killing by selenite in patient-matched pair of normal and malignant prostate cells, *The Prostate* 66: 218 - 225
- Hwa-Young K., Gladyshev V.** (2005) Different catalytic mechanism in mammalian selenocysteine and cysteine containing methionine-R-sulfoxide reductases, *PLoS Biol* 3(12): e375. doi:10.1371/journal.pbio.0030375
- Chandra J., Samali A., Orrenius S.** (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine* 29(3-4): 323 - 333
- Jian'an Tan, Wenyu Zhu, Wuyi Wang, Ribang Li et al.** (2002) Selenium in soil and endemic diseases in China, *The Science of the Total Environment* 284(1-3): 227 - 235
- Jiang C., Jiang W., Ip C., Ganther H., Lu J.** (1999) Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake, *Mol Carcinog* 26(4): 213 - 225
- Jun Lu, Eng-Lui Chew, Holmgren A.** (2007) Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide, *PNAS* 104(30): 12288 - 12293
- Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O. et al.** (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* 300(5624): 1439 - 1443
- Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S.** (2009) The glutathione system. I. Synthesis, transport, glutathione transferases, glutathione peroxidases, *Biomed Khim* 55(3): 255 - 277 (review)
- Lee B.J., Worland P.J., Nathan Davis J., Stadtman T.C., Hatfield D.L.** (1989) Identification of a selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, *J Biol Chem* 264(17): 9724 - 9727
- Letavayová L., Vlasáková D., Spallholz J.E., Brozmanová J., Chovanec M.** (2008) Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat Res* 638(1-2): 1 - 10
- Liping Fu, Quiong Liu, Lirning Shen, Young Wang** (2011) Proteomic study on sodium selenite-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells, *J Trace Elem Med Biol* 25(3): 130 - 137
- Lippman S.M., Goodman P.J., Klein E.A., Parnes H.L., Thompson I.M. et al.** (2005) Designing the selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT), *J Natl Cancer Inst* 97(2): 94 - 102
- Lippman S.M., Klein E.A., Goodman P.J., Scott Lucia M., Thompson I.M. et al.** (2009) Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers, *JAMA* 301(1): 39 - 51
- Lu J.** (2001) Apoptosis and angiogenesis in cancer prevention by selenium, *Adv Exp Med Biol* 492: 131 - 145

- MacFarquhar J.K., Broussard D.L., Melstrom P., Hutchinson R., Wolkin A., et al.** (2010) Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement, *Arch Intern Med* 170(3): 256 - 261
- Méplan C., Hughes D.J., Pardini B., Naccarati A., Souček P. et al.** (2010) Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer, *Carcinogenesis* 31(6): 1074 - 1079
- Moxon A.L.** (1937) Alkali disease, or selenium poisoning, *Bull* 331, South Dakota Agric Exp Sta, Brookings
- Mustacich D., Powis G.** (2000) Thioredoxin reductase, *Biochem J* 346(Pt 1): 1 - 8 (review)
- Nickel A., Kottr G., Schmidt G., Danier J., Hofmann T., Daniel H.** (2009) Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporter, *Chem Biol Interact* 177(3): 234 - 241
- Panee J., Stoytcheva Z.R., Liu W., Berry M.J.** (2007) Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification, *The Journal of Biological Chemistry* 282(33): 23759 - 23765
- Papp L.V., Lu J., Holmgren A., Khanna K.K.** (2007) From selenium to selenoproteins : Synthesis, identity and their role in human health, *Antioxidants and redox signaling* 9(7): 775 - 806 (review)
- Reeves M.A., Hofmann P.R.** (2009) The human selenoproteome : recent insights into functions and regulations, *Cell Mol Life Sci* 66(15): 2457 - 2478 (review)
- Sang-Oh Yoon, Moon-Moo Kim, Soo-Jin Park, Dohoon Kim, et al** (2001) Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3K/Akt pathways, *The FASEB Journal* 16(1): 111 - 113
- Seo Y.R., Sweeney C., Smith M.L.** (2002) Selenomethionin induction of DNA repair response in human fibroblasts, *Oncogene* 21(23): 3663 - 3669
- Shchedrina V.A., Zhang Y., Labunskyy V.M., Hatfield D.L., Gladyshev V.** (2010) Structure–Function Relations, Physiological Roles, and Evolution of Mammalian ER-Resident Selenoproteins, *Antioxid Redox Signal* 12(7): 839 - 849 (review)
- Schreck R., Rieber R., Baeuerle P.A.** (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1, *EMBO J* 10(8): 2247 - 2258
- Schwarz K., Foltz C.M.** (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration, *J Am Chem Soc* 79(12): 3292 - 3293
- Sinha R., El-Bayoumy K.** (2004) Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds, *Curr Cancer Drug Targets* 4(1): 13 - 28
- Smith M.L., Lancia J.K., Mercer T.I., Ip C.** (2004) Selenium compounds regulate p53 by common and distinctive mechanisms, *Anticancer Research* 24: 1401 - 1408
- Song H., Hur I., Park H., Nam J., Park G.B. et al.** (2009) Selenium inhibits metastasis of murine melanoma cells through the induction of cell cycle arrest and cell death, *Immune netw* 9(6): 236 - 242
- Steevens J., van der Brandt P.A., Goldbohm R.A., Schouten L.J.** (2009) Selenium status and the risk of esophageal and gastric cancer : The Netherlands cohort study, *Gastroenterology* 138(5): 1704 - 1713
- Streicher K.L., Sylte M.J., Johnson S.E., Sordillo L.M.** (2004) Thioredoxin reductase regulates angiogenesis by increasing endothelial cell-derived vascular endothelial growth, *Nutr. Cancer* 50(2): 221 - 231
- Sunde A.R.** (1999) Molecular selenium nutrition : A journey from rats to molecular biology, *A. L. Moxon Honorary Lectures, Special circular* 167 - 199

- Suzuki K.T., Kurasaki K., Suzuki N.** (2007) Selenocysteine  $\beta$  lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide, *Biochim Biophys Acta* 1770(7): 1053 - 1061
- Van der Brandt P.A., Zeegers M.P.A., Bode P., Goldbohm R.A.** (2003) Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer. A prospective cohort study, *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* 12(9): 866 - 871
- Veres Z., Kim I.Y., Scholz T.D., Stadtman T.C.** (1994) Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction, *J Biol Chem* 269(14): 10597 - 10603
- Vogt T.M., Ziegler R.G., Graubard B.I., Swanson C.A., Greenberg R.S. et al.** (2003) Serum selenium and risk of prostate cancer in U.S. blacks and whites, *International Journal of Cancer* 103(5):664 - 670
- World health organization** (1996), Trace elements in human nutrition and health, 361 pages
- Xue-Ming Xu, Carlson B.A., Mix H., Zhang Y., Saira K., et al.** (2007) Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes, *PloS Biol* 5(1): e4.doi:10.1371/journal.pbio.0050004
- Zeegers M.P.A., Goldbohm R.A., Bode P., van der Brandt P.A.** (2002) Prediagnostic toenail selenium and risk of bladder cancer, *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* 11(11): 1292 - 1297
- Zhao R., Domann F.E., Zhong W.** (2006) Apoptosis induced by selenomethionin and methioninase is superoxide mediated and p53 dependent in human prostate cancer cells, *Mol Cancer Ther* 5(12): 3275 - 3284
- Zhong L., Arnér E.S.J., Holmgren A.** (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox active selenothiol/selenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5854 - 5859
- Zolotarev A.S., Unnikrishnan M., Shmukler B.E., Clark J.S., Vidorpe D.H. et al.** (2008) Increased sulfate uptake by E.coli overexpressing the SLC26 related SulP protein Rv1739c from Mycobacterium tuberculosis, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 149(3): 255 - 266