

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Plzni  
Ústav farmakologie a toxikologie**



Autoreferát disertační práce

**Účinky vybraných přírodních látek na  
antioxidační systém organismu**

---

**EFFECTS OF SELECTED NATURAL SUBSTANCES ON THE  
ANTIOXIDANT SYSTEM OF AN ORGANISM**

**Mgr. Anna Hodková**

Plzeň 2016

Disertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorandského studia na Ústavu farmakologie a toxikologie Lékařské fakulty UK v Plzni.

Uchazeč: Mgr. Anna Hodková  
Ústav farmakologie a toxikologie  
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Školitel: Prof. MUDr. Vladislav Eybl, DrSc.  
Ústav farmakologie a toxikologie  
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Oponenti: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.  
Ústav lékařské chemie a biochemie  
Univerzita Palackého v Olomouci  
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Doc. MUDr. Otto Mayer, CSc.  
II. interní klinika  
Fakultní nemocnice Bory, Plzeň

Stanovisko k disertační práci vypracoval: Ústav farmakologie a toxikologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Autoreferát byl rozeslán dne.....

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací v oboru farmakologie se koná dne.....v.....hodin.

Místo obhajoby: Ústav farmakologie a toxikologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Předseda komise pro obhajobu disertačních prací ve vědním oboru farmakologie:  
Doc. MUDr. Jaroslav Koutenský, CSc.  
Ústav farmakologie a toxikologie  
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

## Obsah:

1	Úvod.....	6
2	Současný stav problematiky.....	6
2.1	Selenoenzymy .....	6
2.2	Studované látky.....	7
3	Cíl práce .....	11
4	Materiál a metody.....	11
4.1	Laboratorní zvířata a vzorky .....	11
4.2	Stanovení.....	11
4.3	Statistické vyhodnocení.....	13
4.4	Chemikálie .....	13
5	Výsledky.....	14
5.1	Vliv oleuropeinu a hydroxytyrosolu, látek z olivového oleje, na aktivitu selenoenzymů thioredoxin reduktasy a glutathion peroxidasy a antioxidační homeostasu v akutním experimentu na potkanech.....	14
5.2	Interakce polyfenolů z červeného vína se selenoenzymy GPx-1 a TrxR-1 v akutním experimentu na potkanech.....	15
5.3	Vliv citrusových flavonoidů na antioxidační status potkana v akutním pokusu.....	16
5.4	Vliv melatoninu na antioxidační obranný systém zdravých a kadmiu vystavených potkanech .....	16
5.5	Vliv železitých iontů na aktivitu selenoenzymů a oxidativní poškození jater potkanů - interakce s přírodními antioxidanty a deferipronem.....	17
6	Diskuse .....	19
7	Závěr.....	27
8	Literatura .....	29
9.	Přehled publikační činnosti autora .....	39

## Abstrakt

Cílem této práce bylo porovnání účinku vybraných přírodních látek na antioxidační obranný systém organismu za srovnatelných podmínek se zvláštním zaměřením na ovlivnění aktivity selenoenzymů thioredoxin reduktasy (TrxR-1) a glutathion peroxidasy (GPx-1). Pokusy byly prováděny na potkanech (kmen Wistar, samci). Ve všech pokusech byla odebrána játra, v některých i ledviny. Z odebraných orgánů byly vytvořeny tkáňové homogenáty a v nich byla následně stanovována aktivita TrxR-1 a GPx-1, glutathion reduktasy (GR), katalasy (CAT) a superoxid dismutasy (SOD) a hladina redukováného glutathionu (GSH) a hladina peroxidace lipidů (LP).

Prokázali jsme významný vliv vybraných přírodních látek na redox-systém včetně ovlivnění selenoenzymů TrxR-1 a GPx-1. Největší vliv na aktivitu selenoenzymů TrxR-1 a GPx-1 měl oleuropein (OLEU) a hydroxytyrosol (HT). V jaterní tkáni potkana došlo po podání těchto látek k výraznému snížení aktivity u obou uvedených enzymů, ve tkáni ledvin došlo pouze ke snížení aktivity GPx-1. Aktivita TrxR-1 byla snížena resveratrolem (RSV) v jaterní tkáni potkana a myricetinem (MYR) v jaterní i ledvinové tkáni potkana. GPx-1 byla v jaterní tkáni potkana snížena všemi uvedenými polyfenoly červeného vína (resveratrol, myricetin, quercetin a epicatechin), v ledvinové tkáni pouze MYR, quercetinem (QUE) a epicatechinem (EPI). Látky naringin (NAR), naringenin (NRG), hesperidin (HSP) a hesperetin (HST) neovlivnily aktivitu TrxR-1 v jaterní tkáni potkana. Aktivita GPx-1 byla navýšena NAR a NRG v jaterní tkáni potkana. Zajímavým zjištěním byl pozitivní vliv těchto látek na hladinu GSH v jaterní tkáni potkana. Hladina GSH byla navýšena HST, NAR a NRG. Významný vliv na aktivitu enzymů TrxR-1 a GPx-1 měl melatonin (ME), který aktivitu obou enzymů navýšil. Sledovali jsme vliv železa (Fe) na oxidační stres a jeho ovlivnění premedikací vybranými látkami (deferipron, naringin, naringenin, myricetin a quercetin). Aktivita GPx-1 byla železitými ionty indukována. Toto navýšení bylo premedikací deferipronem (L1), QUE a NAR sníženo na kontrolní hladinu. Aplikace MYR naopak toto navýšení ještě podpořila. Aktivita TrxR-1 byla taktéž navýšena aplikací železitými ionty. Toto navýšení bylo premedikací L1 a QUE sníženo na kontrolní hladinu. V případě aplikace pouze uvedených látek, tedy bez následné aplikace železitých iontů, byla aktivita GPx-1 signifikantně snížena a aktivita TrxR-1 zvýšena všemi uvedenými látkami.

Některá naše zjištění jsou prvotní a originální (OLEU, HT, ME). Jsou tedy vhodná pro budoucí studium.

## Summary

The aim of this study was to compare the effects of selected natural substances on the antioxidant defense system under comparable conditions, focusing on influencing the activity of selenoenzymes thioredoxin reductase (TrxR-1) and glutathione peroxidase (GPx-1). Experiments were performed in rats (Wistar, male). Livers, and kidneys were collected in experiments. Homogenates were created from the collected organs and subsequently the activity of TrxR-1 and GPx-1, glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LP) levels were determined. We demonstrated significant effects of selected natural substances on the redox system, including influences of selenoenzymes TrxR-1 and GPx-1. The biggest influence on the activity of selenoenzymes TrxR-1 and GPx-1 had oleuropein (OLEU) and hydroxytyrosol (HT). In rat liver tissue there was a significant decrease of the activity of both above mentioned enzymes after administration of these agents, however in kidney tissue only the GPx-1 activity was reduced. The TrxR-1 activity was reduced by resveratrol (RSV) in rat liver tissue and by myricetin (MYR) in rat liver and kidney tissue. GPx-1 was reduced in the liver tissue of rats by all of the above mentioned red wine polyphenols and in kidney tissue only by MYR, quercetin (QUE) and epicatechin (EPI). The substances naringin (NAR), naringenin (NRG), hesperidin (HSP) and hesperetin (HST) did not affect the TrxR-1 activity in rat liver tissue. The GPx-1 activity was increased by NAR and NRG in rat liver tissue. An interesting finding was the positive influence of these substances on the GSH level in rat liver tissue. The GSH level was increased through HST, NAR and NRG. Melatonin (ME) had a significant effect on the activity of enzymes TrxR-1 and GPx-1, and increased the activity of both enzymes. We investigated the effect of iron on oxidative stress and its effect on selected pretreatment agents (deferiprone, naringin, naringenin, myricetin and quercetin). The GPx-1 activity was induced by ferric (FeIII) ions. This increase was reduced by pretreatment of deferiprone (L1), QUE and NAR to the control level. On the contrary, the application of MYR supported this increase. The TrxR-1 activity was also increased by application of ferric (FeIII) ions. This increase was reduced by the pretreatment of L1 and QUE to the control level. In case of application of the above mentioned substances only, without subsequent application of ferric (FeIII) ions, the GPx-1 activity was significantly reduced and the TrxR-1 activity increased by all of these substances. Some of our findings are the first in the field (OLEU, HT, ME) and are therefore suitable for future studies.

## Seznam použitých zkratk

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
Asn	asparagin
b.w.	body weight = hmotnost
CAT	katalasa
CCl <sub>4</sub>	tetrachlormethan, chlorid uhličitý
Cd	kadmium
CdCl <sub>2</sub>	chlorid kademnatý
Cys	cystein
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová) kyselina, Ellmanovo činidlo
EPI	epicatechin
FAD	flavinadeninukleotid
Fe	železo
FeIII	železitý kation
Gly	glycin
GPx	glutathion peroxidasa
GR	glutathion reduktasa
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HSP	hesperidin
HST	hesperetin
HT	hydroxytyrosol
i.p.	intra peritoneum
IARC	International Agency for Research on Cancer
LI	deferipron
LP	peroxidace lipidů
Lys	lysin
MDA	malondialdehyd
ME	melatonin
MYR	myricetin
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NAR	naringin
NRG	naringenin
OLEU	oleuropein
p.o.	per os
Pro	prolin
Pt	platina
QUE	quercetin
RSV	resveratrol
s.c.	sub cutaneous
SD	směrodatná odchylka
SeCys	selenocystein
SOD	superoxid dismutasa
TBA	kyselina thiobarbiturová
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
Trp	tryptofan
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxin reduktasa
Val	valin
WHO	World Health Organisation

# 1 Úvod

## Oxidační stres

Život není možný bez kyslíku a okysličování (oxidace). Jako vedlejší produkt oxidace a látkové výměny se tvoří tzv. volné radikály, které intenzivně chemicky reagují s molekulami tkání, jejichž funkce a integrita je tím narušena. Za normálních okolností by měla být tvorba kyslíkových radikálů a jejich odstraňování v rovnováze. Situace, kdy si organismus nemůže vlastními silami poradit s odstraněním radikálů a dalších škodlivin z nich vzniklých, se nazývá oxidační stres. Oxidační stres se podílí na celé řadě nežádoucích stavů, nemocí a celkového poškození tkání. Například předčasné stárnutí, infarkt myokardu a iktus, stařecká porucha zraku, bolesti a záněty kloubů, špatné hojení ran, maligní nádory, poškození plodu, poruchy imunity provázející diabetes, atd.

Na vzniku oxidačního stresu se v našem prostředí podílí cigaretový kouř, výfukové plyny a další znečištění životního prostředí, nadměrná psychická a fyzická zátěž, alkohol, ultrafialové a radiační záření a některé léky (Halliwell, 2011).

Antioxidanty jsou všechny látky, které jsou schopné zachytit především volné radikály kyslíku a včas s nimi reagovat na neškodné sloučeniny, čímž brání oxidačnímu poškození. Používají se nejen v medicíně na ochranu našeho zdraví, ale i v potravinářství k ochraně potravin. Obecně, látky likvidující volné radikály všeho druhu, se nazývají zhášeci či zametači volných radikálů.

## 2 Současný stav problematiky

V našich pokusech se zabýváme především ovlivněním selenoenzymů přírodními látkami a dále pak ovlivněním dalších ukazatelů oxidačního stresu.

### 2.1 Selenoenzymy

Funkčně můžeme rozlišit dvě odlišné rodiny enzymů. První zahrnuje glutathion peroxidasu a thioredoxin reduktasu, které zasahují do kontroly tkáňových koncentrací vysoce reaktivních kyslíkových částic. Tyto metabolity jsou v malém množství esenciální pro udržování buněčné imunity, ale ve velkém množství jsou vysoce toxické. Do druhé rodiny patří jodthyronin dejodasa, důležitá pro tvorbu hormonů štítné žlázy (St Germain and Galon, 1997).

## **Thioredoxin reduktasa**

Thioredoxin reduktasy jsou pojmenovány pro jejich schopnost redukovat oxidované thioredoxiny, což je skupina malých (10-12 kDa), všudypřítomných peptidů, které mají -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys- katalytické místo, kde dochází k reverzibilní oxidaci a redukci dvou cysteinových zbytků. Redoxní aktivita na tomto katalytickém místě je nezbytná pro biologickou aktivitu thioredoxinů (Freemerman et al., 1999, Oblong et al., 1994). Thioredoxin reduktasa se vyskytuje ve třech formách. Toto uskupení se nazývá thioredoxinový systém.

Další thiol redukční systém, který se vyskytuje v buňkách, je glutathionový systém (součástí je glutathion reduktasa a glutathion). Stejně jako thioredoxinový systém, tak i glutathionový systém využívá NADPH jako zdroje elektronů. Mezi těmito dvěma systémy není známá žádná funkční interakce. Glutathionový systém hraje klíčovou roli při ochraně buňky před poškozením v důsledku působení volných reaktivních kyslíkových radikálů a elektrofilů (Mustacich and Powis, 2000).

Thioredoxin systém společně s glutathionovým systémem jsou hlavními regulátory intracelulárního redox prostředí.

Při studiu TrxR je důležité zaměřit se na její inhibitory, kterých je celá řada. Ve skutečnosti, se mnoho látek používaných v klinické praxi, ukázalo být inhibitory TrxR.

## **Glutathion peroxidasa**

Hlavní rolí všech GPx je udržovat nízké hladiny peroxidů v buňkách a chránit buněčné struktury před oxidačním stresem. Ten způsobuje samotný peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a z něj vzniklé hydroxylové radikály ( $\cdot OH$ ), které jsou vysoce reaktivní. GPx katalyzují rozklad  $H_2O_2$  a hydroperoxidů mastných kyselin (ROOH) pomocí GSH, který slouží jako donor elektronu. Produkty této reakce jsou příslušné alkoholy a voda.

Glutathion peroxidasa se vyskytuje v osmi formách. GPx je součástí glutathionového systému, který následně zahrnuje glutathion, glutathion reduktasu a glutathion S-transferasu.

## **2.2 Studované látky**

V našich pokusech jsme zkoumali přírodní látky flavonoidy. Tyto látky jsou velmi početnou skupinou. Je známo přes 4000 látek, které se řadí do této skupiny. Během současné doby jsou objevovány další molekuly řadící se mezi flavonoidní látky.

Základní stavební jednotkou flavonoidů je flavan. Jedná se o heterocyklické sloučeniny, obsahující dvě benzenová jádra, spojená heterocyklickým pyranem. Bývají různě substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, přičemž jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace.



Pro naše pokusy jsme vybrali:

### **Oleuropein a hydroxytyrosol: složky olivového oleje**

Oleuropein byl v roce 1960 izolován a charakterizován z oliv, jeho struktura byla plně zjištěna o deset let později. Nachází se nejen v plodech, ale také v listí olivovníků (*Olea europea*) a dalších rostlinách z čeledi olivovitých, například v jasaněch (*Fraxinus sp.*) a šejfících (*Syringa sp.*). Způsobuje typickou hořkost olivového oleje. Tento přírodní polyfenol je velmi účinný antioxidant (nejvyšší, jaká dosud byla u přírodní antioxidační sloučeniny zaznamenána), který chrání mastné kyseliny před oxidací, zachytává kyslíkové radikály a chrání játra před toxickým působením iontů železa. Byly popsány také jeho protinádorové účinky (Hamdi and Castellon, 2005).

Hydroxytyrosol, jehož prekurzor je již zmíněný oleuropein, je také velmi účinný antioxidant. Nacházejí se společně v olivovém listí a plodech. V čisté formě to je kapalina bez chuti a zápachu. Má mj. imunostimulační a antibakteriální účinky (Granados-Principal et al., 2010).

### **Resveratrol, myricetin, quercetin a epicatechin**

Mezi hlavní účinné látky červeného vína se řadí resveratrol, myricetin, quercetin a epicatechin (Paixão et al, 2008).

Polyfenol resveratrol najdeme v révě vinné (*Vitis vinifera*), a to především v modrých odrůdách. Nicméně poslední výzkumy ukazují, že i v bílém víně, pěstovaném v severních oblastech, lze najít srovnatelné množství RSV jako ve víně červeném. Dále se pak RSV vyskytuje např. v borůvkách, černém rybízu, atd. Tato látka se vyznačuje antioxidačními, antibakteriálními a protinádorovými účinky. Resveratrol brání stárnutí buněk v organizmu, inhibuje koagulaci krevních destiček a má vliv na metabolismus lipidů.

Flavonol myricetin se v přírodě vyskytuje v mnoha rostlinách, např. v hroznech modré révy vinné, bobulích (černý rybíz), ve vřesně voskonosné (*Myrica cerifera*), atd. Je to velmi účinný antioxidant. Má protizánětlivé a protinádorové účinky (Ong and Khoo, 1997).

Quercetin je rostlinný flavonoid, známý pro své silné antioxidační a protizánětlivé účinky (tlumí tvorbu a uvolňování histaminu). Vyskytuje se v hroznech, černém a zeleném čaji, červené cibuli, bobulích (ostružiny či černý rybíz), atd. (Lu J et al., 2006).

Flavonoid epicatechin je stereoizomer catechinu. Zlepšuje průtok krve. Je to silný antioxidant. Vyskytuje se v kakau, resp. v čokoládě, dále pak v červeném víně a zeleném čaji (Panneerselvam et al., 2010).

## **Naringin, naringenin, hesperidin a hesperetin**

Ve šťávě z grapefruitu (*Citrus paradisi*) je obsaženo velké množství účinných látek. Pro naše experimenty jsme vybrali naringin, naringenin, hesperidin a hesperetin.

Naringin patří do skupiny flavonoidů (flavonoidních glykosidů), přírodních látek, jejichž účinky mají velký význam pro prevenci mnoha kardiovaskulárních i nádorových onemocnění. Získávají se z citrusových plodů a obsaženy jsou rovněž v pohance. Naringin je hlavním flavonoidem grapefruitů, přičemž grapefruitové šťávě dodává její charakteristickou natrpklou chuť. Podobně jako další flavonoidy, i naringin zlepšuje pevnost cévních stěn, jejich elasticitu a propustnost. Naringin má i výrazné antioxidační účinky a svým působením na krevní řečiště také zlepšuje prokrvení tkání. Klinické studie prokázaly jeho schopnost snižovat hladinu krevního cukru, což v důsledku zpomaluje ukládání energie do tukové tkáně. V posledních letech se ukazuje, že užívání naringeninů (grapefruitové šťávy) souběžně s léčivými vyvolává mnoho interakcí, které v některých případech mohou být fatální. Tyto vyvolané interakce inhibují funkci cytochromu P450 (CYP3A4) (Owira and Ojewole, 2010).

Flavonoid naringenin, který taktéž způsobuje nahořklou chuť grapefruitů, je považován za účinný antioxidant a má podle některých odborníků přímo revoluční účinek na játra. Místo obvyklého ukládání tuku po jídle donutí játra tuk spalovat. Působí protizánětlivě a podporuje imunitní systém. Naringenin je aglykon naringinu (Felgines et al., 2000).

Hesperidin je glykosid obsažený zejména v nezralých plodech citrusů. Je to silný antioxidant a má protizánětlivé účinky. Snižuje hladinu cholesterolu, krevní tlak, a brání rozvinu nádorových onemocnění (Cho, 2006).

Hesperetin je aglykon hesperidinu. Má také antioxidační a protizánětlivé účinky (Cho, 2006).

## **Melatonin**

Melatonin je hormon, který je produkován epifýzou (nadvěškem mozkovým). Během temnotní fáze dne je jeho produkce největší. U lidské populace má ME vliv na hypotalamo-hypofyzární komplex. Zvýšení jeho hladiny v organismu je spojeno s nutkáním ke spánku. ME má vliv na tzv. cirkadiální rytmy (Ilnerová et al., 2000). Melatonin se podílí na regulaci celoročního biologického cyklu. V průběhu roku se v závislosti na délce dne mění hladina ME v organismu. U živočichů se tyto změny podílí např. na zvýšení produkce pohlavních hormonů na jaře. U člověka je tato jeho funkce silně potlačena. Kromě tohoto působení má ME také vysokou antioxidační aktivitu. Antioxidační účinky melatoninu se mohou projevit zejména při regulaci procesu stárnutí. Melatonin se používá jako hypnotikum při léčbě

primární nespavosti charakterizované špatnou kvalitou spánku ve vyšším věku (Reiter et al., 2000).

## **Železo**

Železo je velmi významným prvkem, v organismu se podílí na přenášení kyslíku k buňkám a tím umožňuje život mnoha organismům na naší planetě. Ve sloučeninách se železo vyskytuje především v mocenství  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Redox potenciál vzájemného přechodu výše zmíněných iontů leží v oblasti, která umožňuje současnou existenci obou forem vedle sebe.

Železo patří mezi tzv. mikrobiogenní prvky, které tvoří obvykle méně než 0,005 % hmotnosti. V lidském těle se nachází asi 3 - 4 g železa. Hlavním zdrojem železa v potravě je maso a vnitřnosti (játra, srdce a slezina). Zdrojem železa jsou ale i luštěniny, listová zelenina a některé ovoce (jahody).

## **Deferipron**

Deferipron je účinný chelátor železa. Používá se při léčbě thalasemie (onemocnění způsobené nedostatečnou nebo chybějící tvorbou jedné z podjednotek hemoglobinu). L1 snižuje kumulaci Fe v organismu (Kontoghiorghes, 2009). Toto onemocnění se vyskytuje převážně v oblasti Středozeří. L1, kromě Fe, vychytává z organismu i ionty dalších kovů, jako např. měď, hliník, zinek a další (Kontoghiorghes et al., 2000). Tato vlastnost je ale považována za velmi nežádoucí účinek v rámci léčby deferipronem.

## **Kadmium**

Kadmium (Cd) je karcinogenní kov (IARC, 1993), který vážně poškozuje životní prostředí. Průmyslové emise, hnojení a kouření cigaret představují největší zdroje kadmia, kterým je člověk běžně vystaven. V těle se kadmium hromadí především v játrech, ledvinách a reprodukčních orgánech (WHO, 1992).

Nežádoucí účinek kadmia je oxidační poškození tkání. Tento jev je považován za prvotní známku jeho toxicity a je spojován s karcinogenezí (Waalkes, 2003, Valko et al, 2006). Oxidační účinek kadmia je nepřímý. Je založen především na inaktivaci thiolových skupin, což následně vede k potlačení funkce antioxidantního systému a mechanismů nutným k opravám DNA (Waalkes, 2003).

### 3 Cíl práce

Cílem práce je porovnání účinku vybraných přírodních látek na antioxidační obranný systém organismu za srovnatelných podmínek se zvláštním zaměřením na ovlivnění aktivity selenoenzymů thioredoxin reduktasy a glutathion peroxidasy.

### 4 Materiál a metody

#### 4.1 Laboratorní zvířata a vzorky

Pokusy byly prováděny na potkanech (*Rattus norvegicus*, kmen Wistar). U každého pokusu je zvlášť uvedeno použité laboratorní zvíře, pohlaví a hmotnost jedinců. Zvířata byla chována v klimatizované místnosti ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) při umělém světelném režimu 12 hodin světlo / 12 hodin tma, s volným přístupem k peletové stravě a pitné vodě.

Zvířata byla usmrcována v éterové anestézii dekapitací. Orgány potřebné pro analýzu byly odebírány ihned po dekapitaci. Tkáně byly ihned po odběru rozděleny: a) vzorky pro stanovení hladiny GSH byly vkládány do kádinky s ledovým roztokem 0,02 M EDTA a vzápětí analyzovány, b) ostatní vzorky byly propláchnuty v 0,9 %  $\ominus$  chloridu sodného, zamrazeny na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté až do analýzy uchovávány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro spektrometrická měření byl použit přístroj Lambda 2S (Perkin Elmer Co, USA) a Cary 100 Bio (Varian Australia).

Ve všech pokusech byla odebírána játra, v některých i ledviny. Z odebraných orgánů byly vytvořeny tkáňové homogenáty, které byly poté centrifugovány 5 min při 1000x g. V supernatantu byla následně stanovována aktivita TrxR-1 a GPx-1, GR, CAT a SOD a hladina GSH a LP. U každého pokusu je následně uvedeno, která metoda byla pro ten který pokus stanovena.

#### 4.2 Stanovení

##### Thioredoxin reduktasa

V našich pokusech jsme stanovovali TrxR-1 [EC 1.8.1.9], která se nachází v cytosolu buňky. Pro stanovení aktivity TrxR-1 se používá kolorimetrická reakce, která je založena na redukci 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoové) kyseliny (DTNB) na 5-thio-2-nitrobenzoovou kyselinu (TNB) za účasti NADPH. Tato reakce se vyznačuje žlutým zbarvením roztoku. Aktivita je měřena spektrofotometricky při 412 nm (Holmgren and Bjornsted, 1995).

### **Glutathion peroxidasa**

V našich pokusech jsme stanovovali GPx-1 [EC 1.11.1.9], která se nachází v cytosolu buňky. Účastní se redukce peroxidu vodíku a hydroperoxidů mastných kyselin a oxidace GSH (Ursini et al., 1995; Marinho et al., 1997). Aktivita GPx-1 je stanovována měřením koncentrace NADPH ve vzorku. Principem je oxidace GSH butylhydroperoxidem za katalýzy GPx-1, kde oxidovaný GSH je převáděn za přítomnosti GR a NADPH na redukovanou formu za současné oxidace NADPH na NADP<sup>+</sup> (Günzler et al., 1974).

### **Glutathion reduktasa**

Glutathion reduktasa [EC 1.6.4.2] katalyzuje redukci oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH). Tento enzym reguluje hladinu GSH v buňce. Jeho aktivita je měřena spektrofotometricky při 412 nm. Reakce je založena na redukci DTNB (Smith et al., 1988).

### **Katalasa**

Tento enzym [EC 1.11.1.6] má čtyři podjednotky, každá z nich obsahuje prostetickou porfyrinovou skupinu obsahující ion Fe<sup>3+</sup>. Katalasa katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu (Jones, 1982). Stanovuje se na základě úbytku peroxidu vodíku z reakční směsi (Aebi, 1972). Aktivita je měřena spektrofotometricky při 240 nm.

### **Peroxidace lipidů**

Hladina peroxidace lipidů byla stanovována na základě koncentrace malondialdehydu (MDA) ve vzorku. MDA je sekundární produkt vznikající štěpením řetězců modifikovaných mastných kyselin. Pro jeho stanovení byla použita reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), kde MDA reaguje s TBA v kyselém prostředí za vzniku fialového produktu, který se měří spektrofotometricky při 520 a 535 nm (Mihara and Uchiyama, 1978).

### **Redukovaný glutathion (GSH)**

Hladina redukovaného glutathionu byla stanovována metodou s Ellmanovým činidlem. DTNB je redukována SH skupinami na 2-nitro-5-merkaptobenzoovou kyselinu za vzniku žlutého produktu, který se měří spektrofotometricky při 412 nm (Sedlak and Lindsay, 1968). Pokles redukovaného glutathionu ( $\gamma$ -glutamylcysteinglycin) je jedním z nejvýznamnějších indikátorů oxidačního stresu (DeLeve and Kaplowitz, 1991). Je to také substrát pro glutathionperoxidasy a glutathiotransferasy.

### **Superoxid dismutasa**

Role superoxid dismutasy [EC 1.15.1.1] v organismu je urychlit dismutaci (zhašení) toxického superoxidového radikálu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), který vzniká během oxidačních reakcí v organismu.

Principem stanovení je generování superoxidového radikálu pomocí xantinu a xantin oxidasy, který reaguje s 2-(4-iodfenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazol chlorid (I.N.T.) za vzniku barevné sloučeniny. Aktivita SOD je stanovena jako schopnost inhibovat tvorbu barevné sloučeniny (Michalski, 1996).

### 4.3 *Statistické vyhodnocení*

Získaná data jsou uváděna jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Není-li uvedeno jinak, pro statistické vyhodnocení pokusů byl použit nepárový Studentův t-test. Hladiny významnosti jsou značeny takto:

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. kontrolní skupina

#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  vs. intoxikovaná skupina

### 4.4 *Chemikálie*

CdCl <sub>2</sub> .2.5H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Deferipron (L1) – poskytnuto Dr. G.J. Kontoghiorghesem	
DTNB	Merck spol. s r.o.
Epicatechin	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Glukonát železa (Ferrlecit®)	Sanofi - Aventis, s.r.o.
Glutathione reductase assay kit	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
GR	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
GSH	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
GSSG	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Hesperetin	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Hesperidin	Sigma-Aldrich spol. s r. o.
Hydroxytyrosol	Cayman Chemical
Melatonin	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Methylcelulosa	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Myricetin	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
NADPH	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Naringenin	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Naringin	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Oleuropein	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Quercetin	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Resveratrol	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
SOD assay kit	Randox laboratories Ltd.
TBA	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
t-butylhydroperoxid	Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Thioredoxin reductase assay kit	Sigma-Aldrich spol. s r.o.

Ostatní chemikálie používané pro laboratorní stanovení byly dodány firmou Sigma-Aldrich® a byly p.a. čistoty.

## 5 Výsledky

### 5.1 *Vliv oleuropeinu a hydroxytyrosolu, látek z olivového oleje, na aktivitu selenoenzymů thioredoxin reduktasy a glutathion peroxidasy a antioxidační homeostasu v akutním experimentu na potkanech*

Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar, 130 – 140 g) byli rozděleni do 3 skupin po 8 jedincích. Zkoumané látky (OLEU a HT) byly rozsuspendovány v 0,5 % methylcelulose a podávány sondou perorálně jednou denně po dobu třech dní. První skupina sloužila jako kontrolní, dostávala pouze methylcelulosu po celou dobu pokusu. Druhé byl podáván roztok OLEU v dávce 120 mg/kg (b.w.). Třetí skupině byl podáván roztok HT v dávce 33,8 mg/kg (b.w.). Dávky testovaných látek jsou v ekvimolárním poměru.

Pokus byl ukončen 24 hodin po poslední dávce účinných látek. Zvířata byla usmrcena dekapitací. Byla odebrána jaterní a ledvinová tkáň pro stanovení aktivity TrxR-1, GPx-1, GR, hladiny LP a GSH. Analýza byla provedena v tkáňových homogenátech.

#### **Výsledky**

V jaterní tkáni došlo po aplikaci OLEU ke snížení aktivity TrxR-1, GPx-1 a GR o 68,6 % (p<0,001), 7,0 % (p<0,001) a 5,2 % (p<0,05) a vlivem HT o 67,9 % (p<0,001), 5,6 % (p<0,001) a 16,5 % (p<0,001). Hladina GSH byla zvýšena HT o 9,2 % (p<0,05). Hladina LP zůstala beze změny.

V tkáni ledvin byla snížena aktivita GPx-1 po aplikaci OLEU o 11,6 % (p<0,001) a i po aplikaci HT o 6,4 % (p<0,05). Hladina LP byla snížena OLEU o 16,0 % (p<0,05) a HT o 17,5 % (p<0,05). Aktivita TrxR-1 a GR a hladina GSH nebyla v této tkáni signifikantně změněna.

#### **Závěr**

V tomto experimentu oleuropein a hydroxytyrosol významně ovlivnily oxidačně redukční rovnováhu v organismu laboratorních potkanů.

Nejvíce tyto látky působily na aktivitu TrxR-1, kdy došlo k jejímu výraznému snížení v jaterní tkáni, což poukazuje na silné antioxidační účinky oleuropeinu a hydroxytyrosolu. GPx-1 byla inhibována OLEU a HT v obou zkoumaných tkáních přibližně stejně. Aktivita GR byla snížena, stejně jako aktivita TrxR-1, pouze v jaterní tkáni potkana. Hydroxytyrosol navýšil hladinu GSH v jaterní tkáni, nikoli v ledvinové. Oleuropeinem a hydroxytyrosolem byla snížena hladina LP v ledvinové tkáni.

## **5.2 Interakce polyfenolů z červeného vína se selenoenzymy GPx-1 a TrxR-1 v akutním experimentu na potkanech**

Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar, 130 – 140 g) byli rozděleni do 5 skupin po 8 jedincích. Zkoumané látky (RSV, MYR, EPI a QUE) byly rozsuspendovány v 0,5 % methylcelulose a podávány sondou perorálně jednou denně po dobu třech dní. První skupina sloužila jako kontrolní, dostávala pouze methylcelulosu po celou dobu pokusu. Druhé byl podáván roztok RSV v dávce 25 mg/kg (b.w.). Třetí skupině byl podáván roztok MYR v dávce 34,9 mg/kg (b.w.). Čtvrté byl podáván roztok EPI v dávce 31,8 mg/kg (b.w.). Pátá skupina dostávala roztok QUE v dávce 37 mg/kg (b.w.). Dávky testovaných látek jsou v ekvimolárním poměru.

Pokus byl ukončen 24 hodin po poslední dávce účinných látek. Zvířata byla usmrcena dekapitací. Byla odebrána jaterní a ledvinová tkáň pro stanovení aktivity TrxR-1, GPx-1, GR, hladiny LP a GSH. Analýza byla provedena v tkáňových homogenátech.

### **Výsledky**

V jaterní tkáni došlo po aplikaci RSV a MYR ke snížení aktivity TrxR-1 o 26,5 % ( $p < 0,05$ ) a 30,8 % ( $p < 0,01$ ) a GPx-1 o 17,6 % ( $p < 0,001$ ) a 14,6 % ( $p < 0,01$ ). EPI snížil aktivitu GPx-1 o 10,3 % ( $p < 0,05$ ) a GR o 7,4 % ( $p < 0,05$ ). QUE snížil pouze aktivitu GPx-1 o 17,8 % ( $p < 0,01$ ).

V tkáni ledvin byla snížena aktivita TrxR-1 po aplikaci MYR o 51,6 % ( $p < 0,05$ ). EPI a QUE snížili aktivitu GPx-1 o 15,6 % ( $p < 0,01$ ) a 17,8 % ( $p < 0,01$ ) a GR o 8,1 % ( $p < 0,001$ ) a 5,0 % ( $p < 0,01$ ). EPI a QUE zvýšili hladinu GSH o 7,1 % ( $p < 0,05$ ) a 8,1 % ( $p < 0,05$ ).

### **Závěr**

Polyfenoly z červeného vína (RSV, MYR, EPI a QUE) signifikantně ovlivnily oxidačně redukční rovnováhu v organismu laboratorních potkanů. Významným zjištěním je v tomto pokusu inhibiční vliv resveratrolu a myricetinu na aktivitu selenoenzymů TrxR-1 a GPx-1 v obou zkoumaných tkáních. Tento vliv na aktivitu TrxR-1 dosud nebyl systematicky studován. Červené víno, resp. polyfenoly v něm obsažené, má ochranné antioxidační, ale i případně protinádorové účinky. Mechanismus tohoto účinku bude souviset s thio-redoxinovým systémem. Epicatechinem a quercetinem byla snížena aktivita GPx-1 a GR.



### **5.3 *Vliv citrusových flavonoidů na antioxidační status potkana v akutním pokusu***

Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar, 140 – 150 g) byli rozděleni do 5 skupin: I. - kontrola; II. - HSP; III. - HST; IV. - NAR; V. - NRG. Uvedené látky byly rozsuspendovány v 0,5 % methylcelulose a podávány sondou perorálně ve stejné dávce (20 mg/kg) 1x denně po dobu 3 dní. Pokus byl ukončen 24h po podání třetí dávky dekapitací. Byla odebrána jaterní tkáň. Jaterní homogenát byl použit pro stanovení aktivity TrxR-1, GPx-1, CAT, SOD a hladiny LP a GSH.

#### **Výsledky**

Hladina LP byla navýšena pouze HSP o 14,2 % ( $p < 0,05$ ). Hladina GSH byla navýšena HST, NAR, NRG o 12,0 % ( $p < 0,05$ ), 13,4 % ( $p < 0,05$ ) a 15,9 % ( $p < 0,01$ ). Aktivita GPx-1 byla navýšena NAR, NRG o 16,4 % ( $p < 0,05$ ) a 15,0 % ( $p < 0,05$ ). Látky neměly vliv na aktivitu CAT, TrxR-1 a SOD.

#### **Závěr**

V této studii byl zaznamenán pozitivní vliv vybraných flavonoidů (NAR, NRG, HSP a HST) na hladinu GSH, důležité složky antioxidačního systému organismu. Nejsou ovlivněny enzymy TrxR-1 a SOD. Naringinem a naringeninem byla navýšena aktivita GPx-1. Použité dávky flavonoidů nezvyšovaly hladinu LP a jsou proto vhodné pro další studium.

### **5.4 *Vliv melatoninu na antioxidační obranný systém zdravých a kadmiu vystavených potkanech***

Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar, 130 – 140 g) byli rozděleni do 4 skupin po 8 jedincích: I. kontrola; II. Cd; III. Cd+ME; IV. ME. Melatonin (10 mg/kg b.w.) byl rozsuspendován v 0,5 % methylcelulose a podáván sondou perorálně jednou denně po dobu třech dní. Kadmium ve formě  $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$  (5 mg/kg b.w.) bylo rozpuštěno ve fyziologickém roztoku a podáno subkutánně pouze 1x a to 3. den pokusu. Hodinu po poslední dávce ME. Pokus byl ukončen 24h po podání dávky Cd dekapitací. Byla odebrána jaterní tkáň pro stanovení aktivity TrxR-1, GPx-1, CAT, hladiny LP a GSH. Analýza byla provedena v tkáňových homogenátech.

#### **Výsledky**

Melatonin zvýšil aktivitu TrxR-1 a GPx-1 o 68,4 % ( $p < 0,001$ ) a 9,9 % ( $p < 0,05$ ) a hladinu GSH o 8,8 % ( $p < 0,001$ ). Kadmium (III. skupina), v porovnání s melatoninovou

skupinou (IV. skupina), navýšilo aktivitu TrxR-1 a hladinu GSH o 27,8 % (p<0,001) a 10,0 % (p<0,01) a snížilo aktivitu CAT o 18,1 % (p<0,05). Aktivita GPx-1 a hladina LP nebyla po aplikaci Cd signifikantně ovlivněna.

### **Závěr**

Pokus prokázal signifikantní vliv melatoninu na oxidačně redukční rovnováhu v organismu. Potvrdili jsme také výsledky z našeho předešlého pokusu (A. Hodková, P. Černá, D. Kotyzová, V. Eybl - Melatonin increases the activity of selenoenzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in acute experiments in rats and mice (SFRR – E Meeting, Řím, Itálie, 26. - 29. 8. 2009, Free Radical Research, Vol. 43 (1): s 75, 2009). Aplikací kadmia po premedikaci melatoninem došlo k navýšení aktivity TrxR-1.

### ***5.5 Vliv železitých iontů na aktivitu selenoenzymů a oxidativní poškození jater potkanů - interakce s přírodními antioxidanty a deferipronem***

V tomto experimentu jsou zahrnuty dva samostatné pokusy. V prvním byli použiti samci potkanů kmene Wistar (130 – 140 g b.w.), kteří byli rozděleni do 6 skupin po 8 jedincích: I – kontrola, II – Fe(III) III – Fe(III) + L1, IV – Fe(III) + NAR, V – Fe(III) + QUE, VI – Fe(III) + MYR. Látky L1 (24 mg/kg b.w.), NAR (100 mg/kg b.w.), QUE (58,3 mg/kg b.w.) a MYR (54,8 mg/kg b.w.), byly rozsuspendovány v 0,5 % methylcelulose a podávány sondou perorálně jedenkrát, a to hodinu před aplikací Fe(III). Železo (Fe(III)) ve formě glukonátu železa (Ferrlecit<sup>®</sup>, Sanofi - Aventis, s.r.o., Praha, ČR) bylo podáno intraperitoneálně v dávce 5 mg Fe/kg b.w.. Pokus byl ukončen 24h po podání dávky Fe(III) dekapitací. Byla odebrána jaterní tkáň pro stanovení aktivity TrxR-1 a GPx-1 a hladiny LP a GSH. Analýza byla provedena v tkáňových homogenátech.

V druhém pokusu byli použiti potkani samci kmene Wistar (130–140 g b.w.). Potkani byli rozděleni do 5 skupin po 6 jedincích: I – kontrola, II - L1, III – NAR, IV – QUE, V – MYR. Uvedené látky byly rozsuspendovány v 0,5 % methylcelulose a podány sondou perorálně jednorázově a to v dávkách: L1 (24 mg/kg b.w.), NAR (100 mg/kg b.w.), QUE (58,3 mg/kg b.w.) a MYR (54,8 mg/kg b.w.). Pokus byl ukončen 24h po podání této dávky uvedených látek dekapitací. Byla odebrána jaterní tkáň pro stanovení aktivity TrxR-1 a GPx-1 a hladiny LP a GSH. Analýza byla provedena v tkáňových homogenátech.

Výsledky jsou uvedené jako průměr ± SD. Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem One - way ANOVA, byl použit test Student – Newman - Keuls Multiple Comparison Test (GraphPad InStat3).

### Výsledky

Výsledky prvního pokusu jsou shrnuty v níže uvedené tabulce s číslem 1. Hladina LP byla po aplikaci Fe(III) zvýšena. Pouze L1 a QUE snížily navýšení hladiny LP, po aplikaci Fe(III), zpět ke kontrolní hladině. Na druhou stranu, NAR a MYR toto navýšení po aplikaci Fe(III) ještě zvýšily. Na hladinu GSH nemělo Fe(III) vliv, ale při premedikaci L1 došlo ke snížení hladiny GSH vzhledem ke skupině, které bylo aplikováno pouze Fe(III). Kombinací MYR a Fe(III) došlo k navýšení hladiny GSH. Aktivita GPx-1 byla Fe(III) indukována. Toto navýšení bylo premedikací L1, QUE a NAR sníženo na kontrolní hladinu. Aplikace MYR naopak toto navýšení ještě podpořila. Aktivita TrxR-1 byla taktéž navýšena aplikací Fe(III). Toto navýšení bylo premedikací L1 a QUE sníženo na kontrolní hladinu.

**Tabulka 1** - Vliv Fe(III) a vybraných látek na hladinu LP a GSH a na aktivitu GPx-1 a TrxR-1 v játrech potkanů

Skupina	N	LP	GSH	GPx-1	TrxR-1
		[nmol MDA/g]	[μmol/g]	[μmol/g/min]	[U/mg proteinů]
kontrola	8	34,85 ± 3,39	3,44 ± 0,20	14,76 ± 0,54	0,39 ± 0,02
Fe(III)	8	39,21 ± 2,70*	3,74 ± 0,30	16,09 ± 0,73 **	0,42 ± 0,03 *
Fe(III)+L1	8	36,52 ± 2,28	3,27 ± 0,44#	14,44 ± 0,66###	0,38 ± 0,02##
Fe(III)+NAR	8	41,82 ± 3,63***	3,47 ± 0,34	15,16 ± 0,79#	0,40 ± 0,02
Fe(III)+QUE	8	38,25 ± 2,20	3,66 ± 0,29	14,82 ± 0,70##	0,39 ± 0,01#
Fe(III)+MYR	8	39,53 ± 2,81*	3,91 ± 0,17*	17,43 ± 0,91 ***###	0,42 ± 0,02 *

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 vs. kontrolní skupina

# p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001 vs. Fe(III) skupina

Výsledky jsou udané jako průměr ± SD.

Výsledky druhého pokusu jsou shrnuty níže v tabulce 2. Hladiny LP a GSH nebyly ovlivněny žádnou z uvedených látek. Pouze MYR navýšil hladinu GSH. Aktivita GPx-1 byla signifikantně snížena. Aktivitu TrxR-1 zvyšovaly všechny uvedené látky.

**Tabulka 2** - Vliv vybraných látek na hladinu LP a GSH a na aktivitu GPx-1 a TrxR-1 v játrech potkanů

		LP	GSH	GPx-1	TrxR-1
Skupina	N	[nmol MDA/g]	[ $\mu$ mol/g]	[ $\mu$ mol/g/min]	[U/mg proteinů]
kontrola	6	40.33 $\pm$ 5.31	3.17 $\pm$ 0.26	20.86 $\pm$ 0.62	0.66 $\pm$ 0.02
deferipron	6	36.43 $\pm$ 5.13	3.49 $\pm$ 0.32	16.79 $\pm$ 0.38***	0.76 $\pm$ 0.01***
naringin	6	40.20 $\pm$ 2.46	3.48 $\pm$ 0.28	17.55 $\pm$ 0.40***	0.79 $\pm$ 0.02***
quercetin	6	39.45 $\pm$ 6.18	3.50 $\pm$ 0.40	17.89 $\pm$ 0.65***	0.85 $\pm$ 0.03***
myricetin	6	36.95 $\pm$ 3.82	3.84 $\pm$ 0.34*	19.43 $\pm$ 0.30***	0.78 $\pm$ 0.02***

\* p<0,05; \*\*\* p<0,001 vs. kontrolní skupina  
Výsledky jsou udané jako průměr  $\pm$  SD.

## Závěr

Výsledky experimentů ukazují zvýšenou aktivitu obou selenoenzymů *in vivo* po aplikaci železitých iontů. Železité ionty navýšily hladinu LP, která byla při premedikaci NAR a MYR ještě navýšena. Naopak premedikace deferipronem a quercetinem toto navýšení snížila na kontrolní hladinu. Aktivita TrxR-1 byla navýšena jak deferipronem tak i přírodními antioxidanty. Ionty železa indukovaly aktivitu GPx-1. MYR tuto indukci ještě navýšil. Ostatními látkami bylo působení FeIII iontů na GPx-1 potlačeno na kontrolní hladinu. Kombinace vlivu železitých iontů a antioxidantů, ať už přírodních nebo průmyslově vyrobených, na selenoenzymy, je vhodná pro další studium.

## 6 Diskuse

V dílčích závěrech jednotlivých kapitol bylo postupně uvedeno, do jaké míry byly ovlivněny vybrané antioxidantní parametry zkoumaného organismu.

Porovnáme-li jednotlivé výsledky získané z analýzy jaterní tkáně potkana mezi sebou (Tabulka 3, str. 21), vyjde nám jako nejlepší antioxidant **oleuropein a hydroxytyrosol**, tedy látky obsažené v olivovém oleji. Antioxidantní účinky oleuropeinu a hydroxytyrosolu jsou známy již delší dobu. Na druhou stranu, vliv OLEU a HT na TrxR-1 dosud nebyl publikován. Inhibiční efekt těchto látek na aktivitu TrxR-1 ukazuje na potenciální protinádorové účinky, jak popisuje Cai W. (Cai et al., 2012) ve své práci týkající se dalších molekul, které taktéž inhibují aktivitu TrxR-1 a tím blokují rozvoj nádorového bujení.

**Vlivem OLEU a HT došlo k velmi výraznému snížení aktivity TrxR-1** v jaterní tkáni potkanů o 68,6 % a 67,9 %. U dalších parametrů (GPx-1 a GR) došlo také k signifikantnímu snížení aktivity v jaterní tkáni potkanů. Toto zjištění snížené aktivity GPx-1 a GR se nám potvrdilo i v literatuře (Cumaoglu et al., 2011, Masella et al., 2004).

Toto zjištění pokládáme za prvotní, ojedinělé a originální. Bylo by žádoucí se dále zabývat studiem těchto přírodních látek v *in vitro* a *in vivo* experimentech v souvislosti s TrxR-1 a GPx-1.

Hepatoprotektivním působením OLEU se ve své práci zabýval Domitrovič R. (Domitrovič R. et al., 2014). Jako modelový organismus použil samce myši BALB/cN. Intoxikace tetrachlormethanem (CCl<sub>4</sub>). Oleuropein v dávkách 100 a 200 mg / kg b.w. byl podáván i.p.: a) jednou denně po dobu 3 po sobě následujících dnů. Následně byl podán CCl<sub>4</sub>, b) jednou denně po dobu 2 po sobě jdoucích dnech 6 h po podání CCl<sub>4</sub>. Intoxikace měla za následek masivní nekrózy jater. Poškození jater bylo spojováno s oxidačním stresem, jelikož došlo k významnému snížení aktivity SOD a hladiny GSH. V obou případech podávání OLEU došlo ke snížení oxidačního stresu, což ukazuje na antioxidační působení této látky.

Antioxidační účinky oleuropeinu a hydroxytyrosolu, látek obsažených v olivovém oleji, jsou spojovány s tzv. středomořskou dietou/stravou. Tento termín v sobě zahrnuje mnoho charakteristik. O středomořské stravě se můžeme relativně často dočíst i v denním tisku či na webu, kde je nejčastěji prezentována jako zdravá strava chránící proti tzv. civilizačním chorobám. V odborných publikacích se s tímto termínem setkáváme v souvislosti s oleuropeinem, hydroxytyrosolem nebo olivovým olejem, se kterým je tato dieta úzce spjata. Uvádí se, že tyto látky, resp. tato strava snižuje riziko rakovinného bujení, chrání před kardiovaskulárními chorobami a oxidačním poškozením DNA volnými radikály (Waterman and Lockwood, 2007).

Na ledvinovou tkáň potkana působily námi vybrané látky jinak než na tkáň jaterní (Tabulka 3, str. 21). V této tkáni se nejvíce projevil vliv myricetinu na TrxR-1, který snížil aktivitu tohoto enzymu o 51,6 %. Aktivita GPx-1 byla snížena oleuropeinem, hydroxytyrosolem, quercetinem a epicatechinem. Dále byla snížena hladina peroxidace lipidů, a to působením oleuropeinu a hydroxytyrosolu. GR aktivita byla snížena pouze quercetinem a epicatechinem. Na druhou stranu hladina redukovaného glutathionu byla mírně navýšena quercetinem a epicatechinem.

**Tabulka 3** - Shrnutí signifikantních výsledků v jaterní a ledvinové tkáni potkana. Data jsou udána v procentech, tedy o kolik byla daná veličina změněna vůči kontrolní skupině. Barvou je pak následně rozlišena aktivace (červeně) nebo inhibice (modře) dané veličiny. Prázdné kolonky představují nesignifikantní změny dané veličiny.

%	Thioredoxin reduktasa (TrxR-1)		Glutathion peroxidasa (GPx-1)		Redukovaný glutathion (GSH)		Peroxidace lipidů (LP)		Glutathion reduktasa (GR)	
	játra	ledviny	játra	ledviny	játra	ledviny	játra	ledviny	játra	ledviny
oleuropein	68,6		7,0	11,6				16,0	5,2	
hydroxytyrosol	67,9		5,6	6,4	9,2			17,5	16,5	
resveratrol	26,5		17,6							
myricetin	30,8	51,6	14,6							
quercetin			17,8	17,8		8,1				5,0
epicatechin			10,3	15,6		7,1			7,4	8,1
naringin			16,4		13,4					
naringenin			15,0		15,9					
hesperidin							14,2			
hesperetin					12,0					
melatonin	68,4		9,9		8,8					

Polyfenoly z červeného vína (resveratrol, myricetin, epicatechin a quercetin) signifikantně ovlivnily oxidačně redukční rovnováhu v organismu laboratorních potkanů. Významným výsledkem je inhibiční vliv těchto studovaných polyfenolů na aktivitu selenoenzymů TrxR-1 a GPx-1. Tento vliv na aktivitu TrxR-1 dosud nebyl systematicky studován. Největší snížení aktivity TrxR-1 bylo pozorováno v experimentech s **resveratrolem a myricetinem**. Inhibiční účinek MYR na TrxR-1 popsal Lu J. (Lu et al., 2006). Pro svou práci použil rekombinantní TrxR a Sec<sup>498</sup>→Cys mutant TrxR (Arnér et al., 1999; Zhong L, Holmgren A, 2000). V jedné části této práce nechal inkubovat TrxR, s různými koncentracemi, vybrané flavonoidy a následně měřil jejich aktivitu. V druhé části použil buňky typu A549, kdy sledoval efekt vybraných flavonoidů na růst těchto buněk pomocí aktivity TrxR.

Naopak, látky **quercetin a epicatechin** neměly signifikantní vliv na aktivitu TrxR-1. Všechny námi vybrané polyfenoly z červeného vína snižovaly aktivitu GPx-1. Nejvíce quercetin a resveratrol, nejméně pak epicatechin. Epicatechin snížil aktivitu i GR. Červené víno, respektive jeho polyfenoly, má ochranné antioxidační, ale i případně protinádorové účinky. Mechanismus tohoto účinku bude souviset s thioredoxinovým systémem.

Červené víno resp. látky v něm obsažené jsou spojovány s pojmem „francouzský paradox“. Francouzský paradox je pojem, který souvisí s pozorováním relativně nižšího výskytu akutních srdečních chorob u obyvatel žijících ve Francii navzdory vysokému příjmu nasycených tuků vyskytujících se v jejich potravě. Poprvé byla tato problematika odborně popsána irským lékařem Samuelem Blackem v roce 1819. Z výzkumu britské Heart foundation vyplývá, že v roce 1999 činil počet úmrtí na akutní srdeční příhodu mezi muži ve věku 35 – 74 let 230 na 100 000 v USA, kdežto pouze 83 na 100 000 ve Francii. Zvýšený příjem červeného vína, které je zvláště bohaté na polyfenoly, je jedním z pravděpodobných vysvětlení tzv. „francouzského paradoxu“. Jedná se především o resveratrol a další flavonoidy. Resveratrol se vyskytuje převážně v červených, ale i v některých bílých vínech. Vyšší koncentrace je pak ve vínech napadených ušlechtilou plísní *Botrytis cinerea*. Protektivní efekt vína je připisován právě antioxidačním účinkům polyfenolických látek v něm obsažených a navíc alkohol obsažený ve víně podporuje absorpci polyfenolických látek z vína ve střevě, a proto je antioxidační účinek vína vyšší než např. účinek samotné hroznové šťávy (Eliášová, 2010; Kubesa, 2010).

Flavonoidy obsažené v citrusech hrají v organismu nezastupitelnou roli. Tyto látky mají významné antioxidační a protinádorové účinky. V našich pokusech jsme se zabývali látkami obsažených v grapefruitu, a to naringinem, naringeninem, hesperidinem a hesperetinem. Největší vliv měly látky **naringin a naringenin** na aktivitu selenoenzymu GPx-1, došlo k jejímu navýšení (Hodková et al., 2010; Ali M. M., El Kader M. A., 2004). Toto navýšení aktivity GPx-1 zmiňují ve své práci Ali M. M. a El Kader M. A. Zkoumali vliv různých dávek naringinu (0, 10, 20, 40, 80 mg/kg b.w.) u hyperglykemických potkanů. Podávání jednotlivých postupných dávek naringinu způsobilo, kromě jiných zkoumaných parametrů, i zvýšení aktivity GPx-1.

Aktivita TrxR-1 naopak nebyla ovlivněna ani jednou z námi vybraných látek. Naringin, naringenin a hesperetin zvyšovaly hladinu GSH, což ukazuje na prooxidační účinek těchto látek (Galati et al., 1999).

V posledních letech se ukazuje, že užívání grapefruitové šťávy souběžně s léčivými vyvolává mnoho interakcí, které v některých případech mohou být fatální. Grapefruitem vyvolané interakce inhibují funkci cytochromu P450 (CYP3A4). Ukazuje se, že grapefruit, na základě vysokého obsahu flavonoidů, je prospěšný v léčbě degenerativních nemocí jako je diabetes či kardiovaskulární onemocnění (Owira P. M, Ojewole J. A., 2010).

Melatonin je hormon produkovaný epifýzou. Výzkumem této látky se podrobně zabývá prof. RNDr. Helena Illnerová, DrSc.

*„V poslední době se hojně mluví a píše o melatoninu jako o možném zázračném léku téměř na všechny neduhy. V zahraničí, zejména ve Spojených státech, lze melatonin koupit, obdobně jako vitamíny, jako doplněk výživy. Melatonin je derivát hydroxyindolu, obdobně jako serotonin, přesně N-acetyl-5-methoxytryptamion. Pro jeho fyziologické působení, je podstatná jak methoxy skupina na aromatickém jádru, tak i acetyl skupina vázaná na aminu postranního řetězce; indolové jádro naopak nezbytné není a může být nahrazeno jiným aromatickým jádrem, např. naftalenem“ (Illnerová H., 1996).*

*„Melatonin byl izolován v roce 1958 A. Lernerem z hovězích epifýz, malých endokrinních žláz s tehdy ještě nerozpoznanou úlohou. Od té doby byl melatonin nalezen ve všech dosud zkoumaných živých organismech, od jednobuněčné mořské řasy Gonyaulax polyedra až po vyšší rostliny, např. merlík lékařský, bezobratlé živočichy, jako jsou ploštěnky, a obratlovce - plazy, ptáky i savce, včetně člověka. Melatonin byl tedy během vývoje druhů zakonzervován. Podstatné je, že u všech živých organismů, ať už jsou aktivní ve dne jako člověk, či v noci jako malí hlodavci, se melatonin tvoří výhradně v noci, je to tedy jakýsi signál noci, který předává do organismu informaci o denní době“ (Illnerová H., 1991).*

*„Denní rytmus v tvorbě je poháněn rytmem v aktivitě enzymu arylalkylamin N-acetyltransferázy, který katalyzuje acetylaci serotoninu na N-acetylserotonin, prekursor melatoninu. Aktivita tohoto enzymu v epifýze potkana je např. v noci až stonásobně i mnohem vyšší než ve dne. Tento robustní rytmus je řízen biologickými hodinami, které se nacházejí v mozku ve dvou shlucích nervových buněk uložených blízko křížení, tj. chiasmatu, optických drah a nazýván proto suprachiasmatická jádra. Zhruba denní, tj. cirkadiánní rytmus v tvorbě melatoninu pokračuje i tehdy, žijí-li živočichové v neperiodickém prostředí, např. ve stálé tmě. V takovém případě biologické hodiny "volně běží" s periodou velice blízkou, ale nerovnající se 24 hodinám, a vysoká tvorba melatoninu vyznačuje subjektivní noc jedince. K 24-hodinovému dnu jsou biologické hodiny, a tudíž i rytmická tvorba melatoninu, synchronizovány pravidelným střídáním světla a tmy, zejména světloú periodou dne.*



Melatoninový signál, tj. vysoká hladina v tělních tekutinách v noci, nepřenáší pouze signál o denní době, ale též o délce dne, tj. o roční sezóně. U všech dosud sledovaných savců se melatonin tvoří po krátkou dobu v průběhu dlouhých letních dnů, ale po dlouhou dobu během krátkých zimních dnů. Melatoninový signál je tudíž součástí řízení denního i ročního programu savčího organismu. Vysoká noční hladina melatoninu v krvi se pohybuje řádově v koncentraci  $10^{-10}$  M; lze tedy předpokládat, že melatonin bude fyziologicky působit při takto nízkých hladinách. Tomu odpovídají i hodnoty nalezených disociačních konstant pro vazbu melatoninu na vysoce afinitní receptory na povrchu buněk, a to v rozmezí  $10^{-11}$  až  $10^{-10}$  M<sup>6</sup> (Illnerová H., 1996, Morgan P. J., 1994). „Tyto melatoninové receptory byly u savců nalezeny přímo v biologických hodinách v suprachiasmatických jádrech, kde navázaný melatonin může zpětně ovlivňovat chod hodin, dále v části hypofýzy nazývané pars tuberalis, kde melatonin může ovlivňovat roční cykly, např. v reprodukční aktivitě, a sporadicky v různých částech mozku v závislosti na živočišném druhu. Mimo mozek byly u savců tyto receptory nalezeny i v oční sítnici, kde se melatonin též tvoří, a dále v cévách, slezině a ledvinách. Melatoninové receptory byly v poslední době vyklonovány a tři subtypy těchto receptorů byly též identifikovány. Jak v savčím organismu působí exogenně podaný melatonin? Melatonin u člověka působí v první řadě jako chronobiotikum, tedy jako látka, která může ovlivňovat cirkadiánní, tj. denní řád organismu“ (Illnerová H., 1996). „Podání melatoninu ve večerních hodinách může způsobit předběhnutí biologických hodin, podání v pozdních nočních a brzkých ranních hodinách pravděpodobně zpoždění hodin. Tohoto účinku melatoninu se užívá k rychlé resynchronizaci vnitřních hodin s novým vnějším časem při letech přes časová pásma. Pravidelné podávání melatoninu jednou za 24 hodin k večeru může též synchronizovat volný chod biologických hodin savců žijících ve stálé tmě či slepých lidí s 24-hodinovým dnem. Melatonin podávaný před usnutím může zkrátit dobu usínání a případně snížit fragmentaci spánku, tj. zlepšit jeho kvalitu. Kromě výše zmíněných chronobiologických účinků, které jsou zřejmě zprostředkovány vazbou melatoninu na specifické receptory, se melatoninu připisuje ještě četné další působení, které není většinou ještě probádáno u lidí a jen nedostatečně u savců. Melatonin údajně působí proti nádorovému bujení a stárnutí. Tento účinek, pokud by byl skutečně dostatečně prokázán, by mohl souviset se schopností melatoninu zbavovat organismus volných radikálů s nespárovaným valenčním elektronem, které mohou dlouhodobě poškozovat velké molekuly, jako jsou např. bílkoviny či nukleové kyseliny. Tento "čistící" účinek melatoninu by se však zřejmě mohl projevit jen při farmakologických dávkách. Ani popisovaný posilující účinek melatoninu na uměle zeslabený imunitní systém savců nebyl ještě zcela prověřen. Ostatní účinky připisované melatoninu,

*např. zvýšení sexuální potence, zabránění početí, prodloužení délky života, ochrana před kardiovaskulárními onemocněními apod. jsou zatím spíše vysloveným přáním než výsledkem hlubokého bádání. V současné době je možné odpovědně prohlásit pouze to, že melatonin působí jako chronobiotikum. Při velkém zájmu o tuto látku a při výskytu vysoce afinitních receptorů pro melatonin na různých strukturách je možné očekávat, že v budoucnu budou seriózně nalezeny a potvrzeny další účinky melatoninu na lidský organismus“ (Illnerová H., 1996).*

V našich experimentech **došlo, působením melatoninu, k navýšení aktivity TrxR-1** v jaterní tkáni potkana o 68,4 %. Vliv ME na TrxR-1 dosud nebyl systematicky studován. Toto naše zjištění je prvotní a originální. Pokus prokázal signifikantní vliv ME na oxidačně redukční rovnováhu v organismu (Hardeland, 2005, Hardeland et. al., 2006).

Potvrdili jsme výsledky z našeho předešlého pokusu (A. Hodková, P. Černá, D. Kotyzová, V. Eybl - Melatonin increases the activity of selenoenzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in acute experiments in rats and mice (SFRR – E Meeting, Řím, Itálie, 26. - 29. 8. 2009, Free Radical Research, Vol. 43 (1): s 75, 2009). Aplikací **kadmia** po premedikaci melatoninem došlo k navýšení aktivity TrxR-1. Melatonin navýšil i aktivitu GPx-1 a hladinu GSH.

Kadmium představuje nebezpečnou složku životního prostředí. Akutní expozice kadmium ukazuje především na poškození jater (Rani et al., 2014). Několik studií na pokusných zvířatech přineslo důkazy, že oxidativní stres je zapojený do toxicity kadmia (Caisova and Eybl, 1986, Manca et al., 1991, Bagchi et al., 1996). Brzóska M. M. (Brzóska et al., 2015) ve své práci popisuje vliv přírodních i syntetických antioxidantů na zmírnění oxidačního stresu vyvolaného kadmium.

Na našem pracovišti byly prováděny další pokusy toxicity kadmia spojené s vlivem antioxidantů. Příkladem může být série pokusů prof. V. Eybla (Eybl V, Kotyzová D, Koutenský J, 2006). Samcům CD myši byl podáván jednou denně po dobu 3 dnů kurkumin (50 mg/kg b.w., p.o.), resveratrol (20 mg/kg b.w., p.o.) a melatonin (12 mg/kg b.w., p.o.), rozptýlené v 0,5 % methylcelulóze. Hodinu po poslední dávce antioxidantů byl podáván CdCl<sub>2</sub> (7 mg/kg b.w., s.c.) všem skupinám premedikovaným antioxidanty. 24 hodin poté byla zvířata dekapitována a v jaterních homogenátech byla stanovena hladina LP a GSH, aktivita CAT a GPx. Koncentrace kadmia byla měřena u jater, ledvin, varlat a mozku pomocí AAS. Kadmium navýšilo hladinu LP (133 %, p<0,001), snížilo hladinu GSH (65 %, p <0,001) a došlo k inhibici CAT (68 %, p<0,001) a GPx aktivity (až 60 %, p<0,001) v játrech. Premedikace kurkuminem, RSV a ME zcela zabránila peroxidaci lipidů vyvolanou kadmium

a inhibovala aktivitu GPx. RSV byl účinný proti Cd-indukované inhibici aktivity CAT ( $p < 0,001$ ). Poklesu hladiny GSH nebylo zabráněno premedikací uvedených antioxidantů. U myši ošetřených samotnými antioxidanty nedošlo ke změně hladin LP, GSH, a aktivit GPx a CAT vůči kontrolní skupině. Premedikace antioxidanty neovlivnila rozdělení kadmia ve tkáních Cd-intoxikovaných myši. Výsledky ukazují, že kurkumin, RSV a ME účinně chrání před vlivem kadmia na hladinu peroxidaci lipidů a zmírňují nepříznivé účinky kadmia na antioxidační stav organismu.

Výsledky pokusu, kde jsme sledovali vliv železa na oxidační stres a jeho ovlivnění premedikací vybranými látkami (deferipron, naringin, naringenin, myricetin a quercetin), jsou shrnuty v tabulkách číslo 1 a 2 str. 18 a 19.

Výsledky experimentů ukazují zvýšenou aktivitu obou selenoenzymů *in vivo* po aplikaci **železitých iontů** (Tabulka 1, str. 18). Hladina LP byla po aplikaci Fe(III) navýšena. Pouze **deferipron a quercetin** snížily navýšení hladiny LP, po aplikaci Fe(III), zpět ke kontrolní hladině. Na druhou stranu, **naringin a myricetin** toto navýšení po aplikaci Fe(III) ještě zvýšily. Na hladinu GSH nemělo Fe(III) vliv, ale při premedikaci L1 došlo ke snížení hladiny GSH vzhledem ke skupině, které bylo aplikováno pouze Fe(III). Kombinací MYR a Fe(III) došlo k navýšení hladiny GSH oproti kontrolní skupině. Aktivita GPx-1 byla Fe(III) indukována. Toto navýšení bylo premedikací L1, QUE a NAR sníženo na kontrolní hladinu. Aplikace MYR naopak toto navýšení ještě podpořila. Aktivita TrxR-1 byla taktéž navýšena aplikací Fe(III). Toto navýšení bylo premedikací L1 a QUE sníženo na kontrolní hladinu.

V pokusu, kdy byly použity jen látky samotné (bez aplikace Fe(III)) nedošlo k ovlivnění hladiny LP a GSH. Pouze MYR navýšil hladinu GSH. Aktivita GPx-1 byla signifikantně snížena a aktivita TrxR-1 byla zvýšena všemi uvedenými látkami (Tabulka 2, str. 19). Naše výsledky týkající se aktivity TrxR-1 nemohly potvrdit inhibiční účinek MYR a QUE na aktivitu TrxR-1 publikovanou jinými autory (Lu et al., 2006). Autor Lu se velmi podílí na zkoumání thioredoxinového systému, který se skládá z thioredoxin reductázy (TrxR), thioredoxinu (Trx), a NADPH. Tento systém vykazuje široké spektrum aktivit v buněčném redoxním kontrolním mechanismu, antioxidační funkci, životaschopnosti buněk a proliferace. V poslední době, selenocystein obsažený v savčí thioredoxin reductase se ukázal jako nový cíl pro vývoj léčiv proti rakovině. Thioredoxin reductasa a thioredoxin jsou nadměrně exprimovány v mnoha agresivních nádorech a nádorové buňky se zdají být závislé na thioredoxinovém systému více, než normální zdravé buňky. V publikaci z roku 2006 (Lu et al., 2006) zkoumal Lu inhibici thioredoxin reductasy pomocí flavonoidů, o kterých

předpokládá, že to jsou protinádorová chemopreventivní činidla, právě díky jejich antioxidačním účinkům. Bylo zjištěno, že myricetin a quercetin mají silné inhibiční účinky na thioredoxin reduktasu (IC50 hodnoty 0,62 resp. 0,97 mikromol / l). Kromě toho mají flavonoly potenciál inhibovat růst A549 buněk se stejnou účinností jako inhibice thioredoxin reduktasy. Aktivita thioredoxin reduktasy v buněčných lyzátech byla snížena po aplikaci myricetinu (> 50 mikromol / l). Buněčný cyklus byl zastaven v S fázi quercetinem a akumulace buněk v G1 fázi byla pozorována v reakci na myricetin. To znamená, že protinádorová aktivita quercetinu a myricetinu, může být v důsledku inhibice thioredoxin reduktasy. Inhibování TrxR vede k buněčné smrti.

Železo mělo vliv na aktivitu obou selenoenzymů *in vivo*. Aktivita TrxR-1 byla navýšena nejen po podání L1, ale také přírodními antioxidanty. Podle našich zjištění měl L1 a QUE, sloučeniny vázající se na železo (FeIII), největší vliv na aktivitu TrxR-1 (Kontoghiorghes, 2009; Ren et al., 2008; Mira et al., 2002). Stimulační účinek přírodních antioxidantů na aktivitu TrxR-1 může být aditivní k antioxidačnímu účinku L1. Hladina LP po podání chelátorů nebyla navýšena. To naznačuje, že dávkování těchto látek v těchto pokusech nebylo v rozmezí toxicity. Další experimenty, využívající především kombinaci chelátorů železa a přírodní antioxidanty, v současné době probíhají a podílí se na objasnění způsobu působení na selenoenzymy a také pro jejich možné využití v klinické léčbě.

## 7 Závěr

Prokázali jsme významný vliv vybraných přírodních látek na redox-systém včetně ovlivnění selenoenzymů thioredoxin reduktasy a glutathion peroxidasy.

1. Největší vliv na aktivitu selenoenzymů thioredoxin reduktasy a glutathion peroxidasy měl oleuropein a hydroxytyrosol. V jaterní tkáni potkana došlo po podání těchto látek k výraznému snížení aktivity u obou uvedených enzymů. Ve tkáni ledvin potkana došlo po podání uvedených látek pouze ke snížení aktivity glutathion peroxidasy. Aktivita thioredoxin reduktasy nebyla v této tkáni po podání oleuropeinu a hydroxytyrosolu signifikantně změněna. Tento vliv, OLEU a HT na TrxR-1, dosud nebyl publikován. Inhibiční efekt těchto látek na aktivitu TrxR-1 ukazuje na potenciální protinádorové účinky. Toto zjištění pokládáme za prvotní a originální.

2. Polyfenoly z červeného vína (resveratrol, myricetin, quercetin a epicatechin) významně ovlivnily oxidačně redukční rovnováhu v organismu laboratorních potkanů. Aktivita thioredoxin reductasy byla snížena resveratrolem v jaterní tkáni potkana a myricetinem v jaterní i ledvinové tkáni potkana. Glutathion peroxidasa byla v jaterní tkáni potkana snížena všemi uvedenými polyfenoly, v ledvinové tkáni pouze myricetinem, quercetinem a epicatechinem.
3. Naringin, naringenin, hesperidin a hesperetin jsou flavonoidy obsažené v citrusích. Tyto látky neovlivnily aktivitu thioredoxin reductasy v jaterní tkáni potkana. Aktivita GPx-1 byla navýšena naringinem a naringeninem v jaterní tkáni potkana. Zajímavým zjištěním byl pozitivní vliv těchto látek na hladinu GSH v jaterní tkáni potkana. Hladina GSH byla navýšena hesperetinem, naringinem a naringeninem.
4. Významný vliv na aktivitu enzymů thioredoxin reductasy a glutathion peroxidasy měl melatonin, který aktivitu obou enzymů navýšil. Vliv ME na TrxR-1 dosud nebyl systematicky studován. Toto naše zjištění je prvotní a originální.
5. Sledovali jsme vliv železa na oxidační stres a jeho ovlivnění premedikací vybranými látkami (deferipron, naringin, naringenin, myricetin a quercetin). Aktivita glutathion peroxidasy byla železitými ionty indukována. Toto navýšení bylo premedikací deferipronem, quercetinem a naringinem sníženo na kontrolní hladinu. Aplikace myricetinu naopak toto navýšení ještě podpořila. Aktivita thioredoxin reductasy byla taktéž navýšena aplikací železitými ionty. Toto navýšení bylo premedikací deferipronem a quercetinem sníženo na kontrolní hladinu. V případě aplikace pouze uvedených látek, tedy bez následné aplikace železitých iontů, byla aktivita glutathion peroxidasy významně snížena a aktivita thioredoxin reductasy zvýšena všemi uvedenými látkami.

## 8 Literatura

Aebi H. Catalase in *Methods of Enzymatic Analysis* ed. HU Bergmeyer. Academic Press, Inc. New York 1972; 2: 673-684.

Agarwal R. Iron, oxidative stress, and clinical outcomes. *Pediatr Nephrol*. 2007;23(8):1195-9.

Ali MM, El Kader MA. The influence of naringin on the oxidative state of rats with streptozotocin-induced acute hyperglycaemia. *Z Naturforsch C*. 2004; 59 (9-10): 726-33.

Alvarez-Gonzalez I et al. The antigenotoxic effects of grapefruit juice on the damage induced by benzo(a)pyrene and evaluation of its interaction with hepatic and intestinal Cytochrome P450 (Cyp) 1a1. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49 (4): 807-11.

Andersson M, Holmgren A, Spyrou G. NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *J Biol Chem*. 1996; 271 (17): 10116-20.

Arnér ES, Nordberg J, Holmgren A. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 225 (1): 268-74.

Arnér ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006; 16 (6): 420-6.

Arnér ES et al. High-level expression in *Escherichia coli* of selenocysteine-containing rat thioredoxin reductase utilizing gene fusions with engineered bacterial-type SECIS elements and co-expression with the selA, selB and selC genes. *J Mol Biol*. 1999; 292 (5): 1003-16.

Arscott LD et al. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 (8): 3621-6.

Bagchi D et al. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol Trace Elem Res*. 1996; 52 (2): 143-54.

Baker A et al. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 1997; 57 (22): 5162-7.

Biswas SK et al. Depressed glutathione synthesis precedes oxidative stress and atherogenesis in Apo-E(-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338 (3): 1368-73.

Björnstedt M et al. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem*. 1995; 270 (20): 11761-4.

Bragadin M et al. Effect of metal complexes on thioredoxin reductase and the regulation of mitochondrial permeability conditions. *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1030: 348-54.

- Brigelius-Flohé R. Selenium compounds and selenoproteins in cancer. *Chem Biodivers.* 2008; 5 (3): 389-95.
- Brzóska MM, Borowska S, Tomczyk M. Antioxidants as a Potential Preventive and Therapeutic Strategy for Cadmium. *Curr Drug Targets.* 2015. [Epub ahead of print]
- Cai W et al. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52 (2): 257-65.
- Caisova D, Eybl V. Effect of Cd<sup>2+</sup>, In<sup>3+</sup>, Ce<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup> and Gd<sup>3+</sup> on lipid peroxidation and glutathione level in liver of mice and rats. *Biologia (Bratislava).* 1986, 41: 1211-9.
- Caisova D, Eybl V. The influence of repeated administration of cadmium and lead on the activity of glutathion peroxidase and the level of lipid peroxidation in mice biomarkers. 1997; *Environment 2*, 57-60
- Casso D, Beach D. A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet.* 1996; 252 (5): 518-29.
- Cicerale S et al. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2009; 49 (3): 218-36.
- Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci.* 2010; 11 (2): 458-79.
- Cighetti G et al. Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32 Suppl 1: 55-60.
- Covas MI et al. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. *Nutrition Reviews* 2006; 64 (4): 20–30.
- Cumaoglu A et al. Effects of olive leaf polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in insulin secreting β-cells. *Acta Biochim Pol.* 2011; 58 (1): 45-50.
- DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1991; 52 (3): 287-305.
- Dolphin D, Poulson R, Avramovic O. (Eds.), *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Metabolic Aspects*, Volumes A and B, Wiley and Sons (1989).
- Domitrović R et al. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacol Res.* 2012: 451-64.
- Elišová E. Význam vybraných polyfenolických látek obsažených ve víně, *Bakalářská práce.* Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2010.
- Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J. Comparative study of natural antioxidants – curcumin, resveratrol and melatonin – in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology* 2006; 225: 150-156.

Eybl V et al. Effect of melatonin, curcumin, quercetin, and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2008; 27 (4): 347-53.

Fabiani R et al. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr.* 2008; 138 (8): 1411-6.

Felgines C et al. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279 (6): G1148-54.

Fitó M et al. Postprandial and short-term effects of dietary virgin olive oil on oxidant/antioxidant status. *Lipids.* 2002; 37 (3): 245-51.

Fitó M et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis.* 2005; 181 (1): 149-58.

Fogliano V, Sacchi R. Oleocanthal in olive oil: between myth and reality. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50 (1): 5-6.

Freemerman AJ, Gallegos A, Powis G. Nuclear factor kappaB transactivation is increased but is not involved in the proliferative effects of thioredoxin overexpression in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 1999; 59 (16): 4090-4.

Galati G et al. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12 (6): 521-5.

García-Alfonso C et al. Horse-liver glutathione reductase: purification and characterization. *Int J Biochem.* 1993; 25 (1): 61-8.

Gasdaska JR, Berggren M, Powis G. Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Differ.* 1995; 6 (12): 1643-50.

Gasdaska JR et al. Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue. *Genomics.* 1996; 37 (2): 257-9.

Gasdaska PY et al. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* 1995; 373 (1): 5-9.

Gasdaska PY et al. Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* 1999; 442 (1): 105-11.

Gladyshev VN, Jeang KT, Stadtman TC. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93 (12): 6146-51.

González A et al. Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. *Br J Cancer.* 2007; 97 (6): 755-60.



Granados-Principal S et al. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev.* 2010; 68 (4): 191-206.

Gromer S et al. A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J.* 1998; 332 (Pt 2): 591-2.

Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1974; 12 (10): 444-8.

Hall L et al. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J.* 1998; 333 ( Pt 1): 5-9.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32 (3): 125-30.

Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334 (3): 769-78.

Han JC, Han GY. A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl) phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal Biochem.* 1994; 220 (1): 5-10.

Hanley MJ et al. Grapefruit juice, lyophilized grapefruit juice, and powdered whole grapefruit inhibit cytochrome P450-mediated triazolam hydroxylation by beagle dog liver microsomes. *J Vet Pharmacol Ther.* 2010; 33 (2): 189-95.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 2005; 27 (2): 119-30.

Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38 (3): 313-6.

Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* 2007; 274 (9): 2163-80.

Hodková A et al. The effect of iron(III) on the activity of selenoenzymes and oxidative damage in the liver of rats. Interaction with natural antioxidants and deferiprone. *Hemoglobin.* 2010; 34 (3): 278-83.

Holmgren A. Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J Biol Chem.* 1977; 252 (13): 4600-6.

Holmgren A. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J Biol Chem.* 1979; 254 (18): 9113-9.

Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 1995; 252: 199-208.

Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396 (1): 120-4.

Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat Res.* 2003; 533 (1-2): 153-71.

Huang X et al. Artificial selenoenzymes: designed and redesigned. *Chem Soc Rev.* 2011; 40 (3): 1171-84.

Cho J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Arch Pharm Res.* 2006; 29 (8): 699-706.

Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem.* 1993; 268 (4): 2571-6.

Chwelatiuk E et al. The effect of orally administered melatonin on tissue accumulation and toxicity of cadmium in mice. *J Trace Elem Med Biol.* 2006; 19 (4): 259-65

Illnerová, H. Melatonin, jeho tvorba a působení. *Bulletin Asociace českých chemických společností.* 1996: 27 (3)

Illnerová H. Melatonin a jeho působení. *Vesmír* 1996; 75 (5): 266–269.

Illnerová, H. v *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*, ed. Klein, D. C., Moore, R.Y., Reppert, S. M., Oxford Univ. Press, New York, str. 197-216 (1991)

Illnerová H et al. Hormones, subjective night and season of the year. *Physiol Res.* 2000; 49 Suppl 1: S1-10.

Iriti M, Varoni EM, Vitalini S. Melatonin in traditional Mediterranean diets. *J Pineal Res.* 2010; 49 (2): 101-5.

Jagetia GC et al. Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin Chim Acta.* 2004; 347 (1-2): 189-97.

Jurczuk M et al. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42 (3): 429-38.

Jones DP. Intracellular catalase function: analysis of the catalytic activity by product formation in isolated liver cells. *Arch Biochem Biophys.* 1982; 214 (2): 806-14.

Kim CY et al. Effect of melatonin on cadmium-induced hepatotoxicity in male Sprague-Dawley rats. *Tohoku J Exp Med.* 1998; 186 (3): 205-13.

Kontoghiorghes GJ. Prospects for introducing deferiprone as potent pharmaceutical antioxidant. *Front Biosci (Elite Ed).* 2009; 1: 161-78.

Kontoghiorghes GJ et al. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferoxamine and deferiprone (L1). *Transfus Sci.* 2000; 23 (3): 211-23.

Korkmaz A et al. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med.* 2009; 15 (1-2): 43-50.

Kotyzová D et al. Effect of chromium (VI) exposure on antioxidant defense status and trace element homeostasis in acute experiment in rat. *Toxicol Ind Health.* 2015; 31 (11): 1044-50.

Kryukov GV et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003; 300 (5624): 1439-43.

Kubesa O. Sledování enzymů a enzymových směsí pro stanovení alkoholu a glycerolu ve víně. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně, Fakulta přírodovědná, 2010.

Kumar A, Dogra S, Prakash A. Protective effect of naringin, a citrus flavonoid, against colchicine-induced cognitive dysfunction and oxidative damage in rats. *J Med Food.* 2010; 13 (4): 976-84.

Lee SR et al. Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 1999; 274 (8): 4722-34.

Lennon BW, Williams CH Jr. Effect of pyridine nucleotide on the oxidative half-reaction of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Biochemistry.* 1995; 34 (11): 3670-7.

Lennon BW, Williams CH Jr. Enzyme-monitored turnover of *Escherichia coli* thioredoxin reductase: insights for catalysis. *Biochemistry.* 1996; 35 (15): 4704-12.

Lennon BW, Williams CH Jr. Reductive half-reaction of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1997; 36 (31): 9464-77.

López-Miranda J et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010; 20 (4): 284-94.

Low SC, Berry MJ. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes *Trends Biochem Sci.* 1996; 21 (6): 203-8.

Lu J et al. Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res.* 2006; 66 (8): 4410-8.

Lu J, Chew EH, Holmgren A. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (30): 12288-93.

Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem.* 2009; 284 (2): 723-7.

Maharaj DS, Glass BD, Daya S. Melatonin: new places in therapy. *Biosci Rep.* 2007; 27 (6): 299-320.

- Manca, D et al. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*. 1991; 67; 303-323.
- Mangas-Cruz MA et. al. Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clin Nutr*. 2001; 20 (3): 211-5.
- Marinho HS, Antunes F, Pinto RE. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22 (5):871-83.
- Marrugat J et al. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *Eur J Nutr*. 2004; 43 (3): 140-7.
- Martín MA et al. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxifiant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54 (7): 956-66.
- Masella R et al. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr*. 2004; 134 (4): 785-91.
- Massey V, Williams CH Jr. On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem*. 1965 Nov; 240 (11): 4470-80.
- May JM et al. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem*. 1997; 272 (36): 22607-10.
- May JM et al. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem*. 1998; 273 (36): 23039-45.
- Meskin MS, Bidlack WR, Randolph RK. *Phytochemicals: Aging and Health*. CRC Press, 2008. ISBN 1-4200-6137-2
- Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978; 86 (1): 271-8.
- Michalski WP. Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996; 684 (1-2): 59-75.
- Mira L et al. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*. 2002; 36 (11): 1199-208.
- Miranda-Vizuete A et al. Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem*. 1999; 261 (2): 405-12.
- Moreno JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35 (9): 1073-81.

Morgan PJ et al. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int.* 1994 Feb; 24 (2): 101-46.

Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 2000; 346 Pt 1: 1-8.

Ng CF et al. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and GPx concentrations. *Free Radic Res.* 2007; 41 (11): 1201-11.

Oblong JE et al. Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry.* 1993; 32 (28): 7271-7.

Oblong JE et al. Site-directed mutagenesis of active site cysteines in human thioredoxin produces competitive inhibitors of human thioredoxin reductase and elimination of mitogenic properties of thioredoxin. *J Biol Chem.* 1994; 269 (16): 11714-20.

Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol.* 1997; 29 (2): 121-6.

Owen RW et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000; 1: 107-12.

Owira PM, Ojewole JA. The grapefruit: an old wine in a new glass? Metabolic and cardiovascular perspectives. *Cardiovasc J Afr.* 2010; 21 (5): 280-5.

Paixão N et al. Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. *J Sep Sci.* 2008; 31 (12): 2189-98.

Panneerselvam M et al. Dark chocolate receptors: epicatechin-induced cardiac protection is dependent on delta-opioid receptor stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299 (5): H1604-9.

Pavlova LE, Savov VM, Petkov HG, Charova IP. Oxidative stress in patients with beta-thalassemia major. *Prilozi.* 2007; 28 (1): 145-54.

Pillay CS et al. Enzymes or redox couples? The kinetics of thioredoxin and glutaredoxin reactions in a systems biology context. *Biochem J.* 2009; 417 (1): 269-75.

Rachmilewitz EA et al. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1054: 118-23.

Rani A et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res.* 2014; 24 (4): 378-99.

Reiter RJ et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci.* 2000; 7 (6): 444-58.

Reiter RJ et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50 (4): 1129-46.

- Reiter RJ et al. Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29 (4): 391-8.
- Reiter RJ et al. Melatonin reduces oxidative/nitrosative stress due to drugs, toxins, metals, and herbicides. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29 (5): 609-13.
- Rampersaud GC, Valim MF. 100% Citrus juice: Nutritional contribution, dietary benefits, and association with anthropometric measures. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015 Apr 1:0. [Epub ahead of print]
- Ren J et al. Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *J Phys Chem B.* 2008; 112 (6): 1845-50.
- Renugadevi J, Prabu SM. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Exp Toxicol Pathol.* 2010; 62 (2): 171-81.
- Rietveld P et al. Reductive and oxidative half-reactions of glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1994; 33 (46): 13888-95.
- Rios ER et al. Melatonin: pharmacological aspects and clinical trends. *Int J Neurosci.* 2010; 120 (9): 583-90.
- Rodriguez C et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004; 36 (1): 1-9.
- Rund D, Rachmilewitz EA. Beta-thalassemia. *N Engl J Med.* 2005; 353 (11): 1135-46.
- Russel M, Model P. Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem.* 1988; 263 (18): 9015-9.
- Seden K et al. Grapefruit-drug interactions. *Drugs.* 2010; 70 (18): 2373-407.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25 (1): 192-205.
- Selenius M et al. Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12 (7): 867-80.
- Schneider M et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.* 2009; 23 (9): 3233-42.
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem.* 1988; 175 (2): 408-13.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. The world of resveratrol. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 492: 159-82.
- Spyrou G et al. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem.* 1997; 272 (5): 2936-41.

St Germain DL, Galton VA. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid*. 1997; 7 (4): 655-68.

Takahashi K et al. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 1987; 256 (2): 677-86.

Tamura T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (3): 1006-11.

Thephinlap C et al. Epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate from green tea decrease plasma non-transferrin bound iron and erythrocyte oxidative stress. *Med Chem*. 2007; 3 (3): 289-96.

Toppo S et al. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (GPx) superfamily. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10 (9): 1501-14.

Ursini F et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 1995; 252: 38-53.

Utomo A et al. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004; 279 (42): 43522-9.

Valko M et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160 (1): 1-40.

Veine DM, Ohnishi K, Williams CH Jr. Thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: evidence of restriction to a single conformation upon formation of a crosslink between engineered cysteines. *Protein Sci*. 1998; 7 (2): 369-75.

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res*. 2003; 533 (1-2): 107-20.

Waksman G et al. Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *J Mol Biol*. 1994; 236 (3): 800-16.

Walter PB et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2006; 135 (2): 254-63.

Wataha JC et al. Effect of Mercury (II) on Nrf2, thioredoxin reductase-1 and thioredoxin-1 in human monocytes. *Dent Mater*. 2008; 24 (6): 765-72.

Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*. 2007; 12 (4): 331-42.

Weinbrenner T et al. Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans. *Drugs Exp Clin Res*. 2004; 30 (5-6): 207-12.

Weinbrenner T et al. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. J Nutr. 2004; 134 (9): 2314-21.

Williams CH Jr. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from Escherichia coli. FASEB J. 1995; 9 (13): 1267-76.

Worthington DJ, Rosemeyer MA. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. Eur J Biochem. 1976; 67 (1): 231-8.

Zhong L, Holmgren A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. J Biol Chem. 2000; 275 (24): 18121-8.

## **9. Přehled publikační činnosti autora**

Tato práce byla řešena za podpory výzkumného záměru MSM 0021620819 a specifického výzkumu LF UK v Plzni.

Výsledky byly průběžně publikovány:

### **Práce *in extenso*:**

A. Hodková, P. Černá, D. Kotyzová, V. Eybl - The effect of iron(III) on the activity of selenoenzymes and oxidative damage in the liver of rats. Interaction with natural antioxidants and deferiprone. Hemoglobin 34 (3): 278-83 (2010) PMID 20524817 (IF=1,31)

D. Kotyzová, A. Hodková, M. Bludovská, V. Eybl - Effect of chromium(VI) exposure on antioxidant defense status and trace element homeostasis in acute experiment in rat. Toxicology and Industrial Health 2015; 31 (11): 1044-50 (IF=1,86)

### **Práce *in abstracto*:**

A. Hodková – Vliv kurkuminu, resveratrolu a selenu na aktivitu selenoenzymů – interakce s kadmíem (48. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, 14. 5. 2008, Sborník abstrakt)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl – Inhibition of thioredoxin reductase and glutathione peroxidase by myricetin, quercetin and resveratrol (TOXCON 2008, Trenčianské Teplice, Slovenská republika, 27. - 30. 5. 2008, Interdisciplinary Toxicology, Vol. 1 (1): s 73, 2008)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - The effect of curcumin, resveratrol and selenium on the activity of selenoenzymes – interaction with cadmium (58. Farmakologické dny, Praha, 3. - 5. 9. 2008, Prague Medical Report, 2008, Vol. 109 Suppl., p.2, s 43)



A. Hodková, D. Kotyzová, J. Brtko, V. Eybl - Influence of curcumin, resveratrol and sodium selenite on thioredoxin reductase, glutathione peroxidase and iodothyronine-5'-deiodinase activity in rats - interaction with cadmium (45. EUROTOX 2008, Rhodos, Řecko, 5. - 8. 10. 2008, Toxicology Letters, 2008, Vol. 180. S S1-S246, s 49) (IF=3,26)

A. Hodková, D. Kotyzová, P. Černá, V. Eybl - The effect of iron (FeIII) on the activity of selenoenzymes and oxidative damage in rats – interaction with natural antioxidants and deferiprone (18. ICOC, Athény, Řecko, 13. - 16. 12. 2008, Sborník abstrakt)

D. Kotyzová, A. Hodková, P. Černá, L. Lešetický, V. Eybl – Cadmium – induced changes in trace elements status in the liver of rats in relation to dietary selenium deficiency (3. International IUPAC Symposium on Trace Element in Food, Řím, Itálie, 1. - 3. 4. 2009, Sborník abstrakt)

A. Hodková – Aktivita selenoenzymů v závislosti na stárnutí – interakce s chalkogeny selenem a telurem v pokusu na myších (49. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, 6. 5. 2009, Sborník abstrakt)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl – The effect of some selected carcinogenic metals on the activity of selenoenzymes in the experiment in rats (TOXCON 2009, Brno, 1. - 3. 6. 2009, Interdisciplinary Toxicology, Vol. 2 (2): s 107, 2009)

A. Hodková, P. Černá, D. Kotyzová, V. Eybl - Melatonin increases the activity of selenoenzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in acute experiments in rats and mice (SFRR – E Meeting, Řím, Itálie, 26. - 29. 8. 2009, Free Radical Research, Vol. 43 (1): s 75, 2009) (IF=2,98)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - Vliv citrusových flavonoidů na antioxidační status potkana v akutním pokusu (59. Farmakologické dni, Bratislava, Slovensko, 2. - 4. 9. 2009, Sborník abstrakt)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - Age related changes in the activity of selenoenzymes in mice – interaction with chalcogen metalloids selenium and tellurium (46. EUROTOX 2009, Drážďany, Německo, 13. - 16. 9. 2009, Toxicology Letters, 2009, Vol. 189. S S1-S274, s 165) (IF=3,26)

D. Kotyzová, P. Černá, A. Hodková, V. Eybl - Effect of zinc pretreatment on acute hepatic oxidative damage induced by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) in rats (46. EUROTOX 2009, Drážďany, Německo, 13. - 16. 9. 2009, Toxicology Letters, 2009, Vol. 189. S: S223) (IF=3,26)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - The influence of citrus flavonoids on the redox homeostasis and trace elements level of iron injured liver in rats (19. ICOC, Londýn, Velká Británie, 13. - 16. 11. 2009, Sborník abstrakt)

A. Hodková – Vliv ACE inhibitoru captoprilu na antioxidační systém v akutním pokusu na potkanech (50. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, 12. 5. 2010, Sborník abstrakt)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - The effect of captopril on the activity of selenoenzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase, redox homeostasis and trace element level in rat liver (WorldPharma 2010, Kodaň, Dánsko, 17. - 23. 7. 2010, BCPT, Vol. 107, S1, 1290, 2010) (IF=2,38)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - The effect of chromium (VI) on the redox homeostasis and the activity of selenoenzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in rat liver and kidneys (IUTOX 2010, Barcelona, Španělsko, 19. - 23. 7. 2010, Toxicology Letters, 2010, Vol. 196, S1 s 208) (IF=3,26)

V. Eybl, D. Kotyzová, A. Hodková – Interaction of captopril with iron (III) – Effect on oxidative stress and mineral status in rats (IUTOX 2010, Barcelona, Španělsko, 19. - 23. 7. 2010, Toxicology Letters, 2010, Vol. 196 S1 s 300-301) (IF=3,26)

A. Hodková, V. Eybl - Effect of olive oil phenolics on selenoenzymes activity and redox homeostasis in rats (SFRR – E Meeting 2010, Oslo, Norsko, 12. - 15. 9. 2010, Sborník abstrakt)

A. Hodková, V. Eybl - The influence of ACE inhibitor captopril on the antioxidative state in acute experiment in rats (60. Farmakologické dny, Hradec Králové, 15. - 17. 9. 2010, Acta Medica)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - Effect of melatonin on the antioxidative defense system in healthy and cadmium exposed rats (TOXCON 2011, Praha, 17. - 20. 5. 2011, Interdisciplinary Toxicology, Vol. 4 (2): s A33, 2011)

A. Hodková – Vliv melatoninu na antioxidační systém v akutním pokusu na zdravých a kadmíem intoxikovaných potkanech (51. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, 19. 5. 2011, Sborník abstrakt)

D. Kotyzová, A. Hodková, V. Eybl - The effect of olive oil phenolics – Hydroxytyrosol and oleuropein on antioxidant defence status in acute arsenic exposed rats (47. EUROTOX 2011, Paříž, Francie, 28. - 31. 8. 2011, Toxicology Letters, 2011, Vol. S205 S222) (IF=3,26)

A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - The interaction of red wine(s) polyphenols with selenoenzymes GPx and TrxR in acute experiment in rat (SFRR – E Meeting 2011, Istanbul, Turecko, 7. - 10. 9. 2011, Sborník abstrakt)

L. Příbylová, D. Kotyzová, A. Hodková, V. Eybl – Inhibition of thioredoxin reductase by polyphenols in vitro (61. Farmakologické dny, Brno, 14. - 16. 9. 2011, Sborník abstrakt)