

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

**ÚČINKY VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA ANTIOXIDAČNÍ  
SYSTÉM ORGANISMU**

**DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE**

Autor: Mgr. Anna Hodková

Studijní obor: Lékařská farmakologie

Školitel: Prof. MUDr. Vladislav Eybl, DrSc.

Plzeň 2016

Charles University in Prague  
Faculty of Medicine in Pilsen  
Department of Pharmacology and Toxicology

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

**DOCTORAL DISSERTATION**

Author: Mgr. Anna Hodková

Study: Medical Pharmacology

Supervisor: Prof. MUDr. Vladislav Eybl, DrSc.

Plzeň 2016

„Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Prof. MUDr. Vladislava Eybla, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Plzni dne.....

Podpis:.....

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Prof. MUDr. Vladislavu Eyblovi, DrSc., nejen za poskytnuté rady a pomoc při vypracování mé disertační práce, ale především za odborné vedení a podporu během mého celého postgraduálního studia.

Dále bych chtěla poděkovat všem na Ústavu farmakologie a toxikologie LF UK v Plzni za velkou pomoc při vědecké činnosti.

Můj velký dík patří i mé rodině za oporu a zázemí, díky kterým jsem se mohla plně věnovat studiu a své práci.

## 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 odebírána 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 redukovaného 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.

## **Anotace**

HODKOVÁ, Anna. *Účinky vybraných přírodních látek na antioxidační systém organismu*. Plzeň: Lékařská fakulta v Plzni Univerzity Karlovy v Praze, 2016. 99 s. Disertační práce.

Text obsahuje základní údaje charakterizující v českém jazyce obsah a výsledky práce.

Klíčová slova: selenoenzymy, thioredoxin reductasa, glutathion peroxidasa, antioxidanty, oxidační stres

## Seznam použitých zkratek

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	flavinadenindinukleotid
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.N.T.	2-(4-iodfenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazol chlorid
i.p.	intra peritoneum
IARC	International Agency for Research on Cancer
L1	deferipron
LP	peroxidace lipidů
Lys	lysin
MDA	malondialdehyd
ME	melatonin
MYR	myricetin
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid



NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADP+	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
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
Se	selen
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

## Obsah:

1	Současný stav problematiky .....	10
1.1	Oxidační stres .....	10
1.2	Volné radikály .....	10
1.3	Antioxidanty .....	11
2	Předmět studia této práce.....	13
2.1	Selenoenzymy.....	13
2.1.1	Thioredoxin reduktasa .....	14
2.1.2	Glutathion peroxidasa.....	20
2.2	Studované látky .....	22
2.2.1	Oleuropein a hydroxytyrosol: složky olivového oleje.....	24
2.2.2	Resveratrol, myricetin, quercetin a epicatechin.....	25
2.2.3	Naringin, naringenin, hesperidin a hesperetin .....	26
2.2.4	Melatonin.....	28
2.2.5	Železo .....	29
2.2.6	Deferipron (L1).....	29
2.2.7	Kadmium .....	30
3	Cíl práce.....	31
4	Materiál a metody .....	32
4.1	Laboratorní zvířata a vzorky.....	32
4.2	Stanovení .....	32
4.2.1	Thioredoxin reduktasa .....	32
4.2.2	Glutathion peroxidasa.....	33
4.2.3	Glutathion reduktasa.....	33
4.2.4	Katalasa .....	33
4.2.5	Peroxidace lipidů .....	34
4.2.6	Redukovaný glutathion (GSH) .....	34
4.2.7	Superoxid dismutasa.....	34
4.3	Statistické vyhodnocení.....	35
4.4	Chemikálie.....	36
5	Výsledky.....	37
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.....	37
5.2	Interakce polyfenolů z červeného vína se selenoenzymy GPx-1 a TrxR-1 v akutním experimentu na potkanech.....	44
5.3	Vliv citrusových flavonoidů na antioxidační status potkana v akutním pokusu ..	51

5.4	Vliv melatoninu na antioxidační obranný systém zdravých a kadmiu vystavených potkanech.....	55
5.5	Vliv železitých iontů na aktivitu selenoenzymů a oxidativní poškození jater potkanů - interakce s přírodními antioxidanty a deferipronem .....	59
6	Diskuse .....	66
7	Závěr.....	75
8	Literatura .....	77
9.	Publikace autora .....	94

# 1 Současný stav problematiky

## 1.1 Oxidační stres

Život není možný bez kyslíku a oksylichování (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).

## 1.2 Volné radikály

V organismu živočichů neustále vznikají částice, které pro organismus představují potenciální nebezpečí. Tyto částice, nazývané volné radikály, obsahují ve své valenční vrstvě nepárový elektron. Radikály se snaží nepárový elektron doplnit a bývají proto velmi reaktivní. Tvoří se v organismu během látkové přeměny či obraně před bakteriemi a vlivem ultrafialového a ionizačního záření.

Jedná se o sloučeniny kyslíku - kyslíkové radikály (superoxid –  $O_2^-$ , hydroxylový radikál –  $HO^-$ , peroxy –  $ROO^-$ , alkoxy –  $RO^-$ , hydroperoxy –  $HO_2^-$ ) a sloučeniny dusíku – dusíkové radikály (oxid dusnatý –  $NO^-$ , oxid dusičitý –  $NO_2^-$ ). Odnímáním nebo přijímáním elektronu dalšími molekulami dochází k tvorbě dalších reaktivních částic. Radikálová reakce pokračuje za vzniku dalších toxických produktů. Terminace (ukončení) radikálových reakcí nastane při setkání dvou molekul s nepárovými elektrony. Volné

radikály tak mohou poškodit buňky (poškození se týká DNA, povrchových membrán buněk i vnitrobuněčných struktur včetně buněčných jader), oslabit imunitní systém a napomáhat tak ke vzniku řady onemocnění. Zvyšuje se nebezpečí vzniku maligního bujení. Látky, které mají schopnost nadbytečné volné radikály eliminovat, se nazývají antioxidanty.

Volné radikály jsou běžnou součástí organismu. K intenzivnější tvorbě volných radikálů dochází vlivem nemocí, psychickou a fyzickou zátěží, kouřením, špatnou životosprávou či znečištěním životního prostředí. (Halliwell, 2011).

Jedním z průvodních jevů stárnutí je zvýšená tvorba volných radikálů a zároveň snížení schopnosti jejich eliminace, což vede nejen ke změně vazivové tkáně, ale i k poruše pružnosti vaziva a vzniku vrásek. Ke změnám však dochází i ve vnitřních orgánech, ve šlachách, svalech a cévách. Vliv volných radikálů přináší rychlejší opotřebenání tělních buněk (Halliwell, 2011).

### **1.3 Antioxidanty**

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 zhášeči či zametači volných radikálů.

Antioxidanty se rozdělují na *enzymatické* a *neenzymatické*.

- Enzymatické antioxidanty jsou enzymy, které katalyzují reakce, při nichž dochází k vychytávání volných radikálů v organismu. Mezi tyto enzymy patří superoxid dismutasa, katalasa, glutathion reductasa a v neposlední řadě selenoenzymy glutathion peroxidasa a thioredoxin reductasa (Jurczuk et al., 2004, Lu and Holmgren, 2009).
- Neenzymatické antioxidanty lze dále dělit na přirozené (přirozeně se vyskytující v přírodě nebo dané potravině) a syntetizované (laboratorně vytvořené, tedy bez výskytu v přírodě). Většinou se upřednostňuje skupina přírodních antioxidantů. Aktuální výzkumy však ukazují, že používání umělých antioxidantů, je relativně

neškodné. Na druhou stranu, výzkumy dlouhodobého (celoživotního) užívání syntetických antioxidantů, zatím, dokončeny nejsou. Mezi neenzymatické antioxidanty patří například vitamín A a provitamín A, vitamín C, E a K, koenzym Q10, glutathion, bilirubin či flavonoidy a další (Jurczuk et al., 2004, Weinbrenner et al., 2004).

## 2 Předmět studia této práce

### 2.1 Selenoenzymy

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

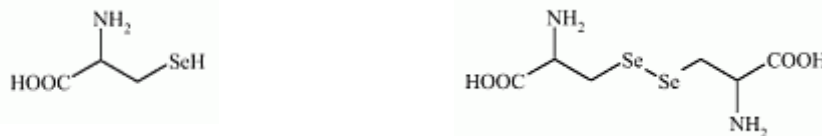
Selen je pro organismus jedním z velmi potřebných stopových prvků. Jeho účinek zasahuje do mnoha fyziologických i biochemických pochodů v živých organismech.

V posledních dvou desetiletích znalosti o tomto prvku značně vzrostly a tento zájem je dále podporován objevem nových selenoproteinů. Všechny funkce těchto selenoproteinů nejsou ještě plně známy, nyní ale víme, že selen je důležitý pro prevenci některých nádorových a kardiovaskulárních onemocnění, imunitní funkce a plodnost. Ve formě enzymů je jednou z nejaktivnějších složek antioxidační a antiradikálové ochrany organismu (Lu and Holmgren, 2009).

Selen je v nízkých dávkách esenciální prvek, ale ve vysokých dávkách je toxický. Jeho příjem závisí především na obsahu selenu v půdě. Od obsahu selenu v půdě se odvíjí jeho koncentrace v rostlinných pletivech a živočišných tkáních. Existují značné geografické rozdíly v množství selenu v půdě. Česká republika patří mezi oblasti s poměrně nízkým obsahem selenu v půdě. S velkým deficitem selenu v půdě se potýkají např. Švédsko a ostatní země Skandinávie.

Kromě selenu působí jako antioxidanty i vitamíny A, C, E. Jejich nedostatek se dá selenem částečně kompenzovat. Selen se díky vazbě na bílkoviny nevstřebává tak rychle jako ostatní antioxidanty. Kromě toho má asi 1000x větší účinnost než vitamín E.

Selen se v selenoproteinech vyskytuje ve formě selenocysteinu, který má obdobnou strukturu jako cystein, kde je atom síry nahrazen atomem selenu. Oxidačním produktem selenocysteinu je selenocystin, ve kterém se dvě -SeH skupiny přemění na jednu skupinu -Se-Se- (Obrázek 1, str. 14). V těle je selenocystin metabolizován na selenocystein. Selenocystein je jediná sloučenina selenu, která je součástí účinných selenoenzymů (Selenius et al., 2010).



**Obrázek 1** – Oxidací selenocysteinu (vlevo) vzniká selenocystin (vpravo)

Selen je důležitou součástí antioxidantních enzymů, které chrání buňku proti účinku volných radikálů. V současné době je identifikováno přibližně 18 odlišných savčích selenoenzymů a selenoproteinů. Předpokládá se, že počet selenoproteinů v těle vyšších živočichů je 30 - 50, z čehož vyplývá, že umíme identifikovat pouze polovinu.

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 dekodasa, důležitá pro tvorbu hormonů štítné žlázy. Vyskytuje se ve třech formách: forma 1 ([EC 1.97.1.10]) se vyskytuje téměř ve všech tkáních, nejvíce v játrech, ledvinách, štítné žláze a hypofýze; forma 2 ([EC 1.97.1.10]) se vyskytuje především ve štítné žláze, srdci, mozku, míše, kosterních svalech, placentě a hypofýze; forma 3 ([EC 1.97.1.11]) je přítomna ve všech buňkách vázaná na plasmatickou membránu, nevyskytuje se ale ve štítné žláze, játrech ledvinách a hypofýze (St Germain and Galon, 1997).

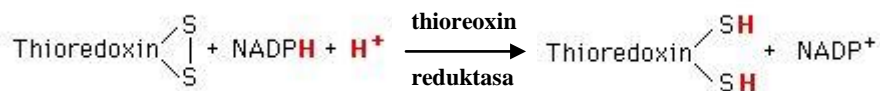
### 2.1.1 Thioredoxin reduktasa

Savčí thioredoxin reduktasy jsou enzymy, které patří do rodiny oxidoreduktas. Členové této rodiny jsou homodimerní proteiny. Každý monomer obsahuje flavinadenindinukleotidovou (FAD) prostetickou skupinu, vazebné místo pro redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) a aktivní centrum obsahující disulfid, na kterém probíhá redukce substrátu (Mustacich and Powis, 2000).

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 redukcii



dvou cysteinových zbytků. Redoxní aktivita na tomto katalytickém místě je nezbytná pro biologickou aktivitu thioredoxinů (Freemerman et al., 1999, Oblong et al., 1994). Toto uskupení se nazývá thioredoxinový systém.



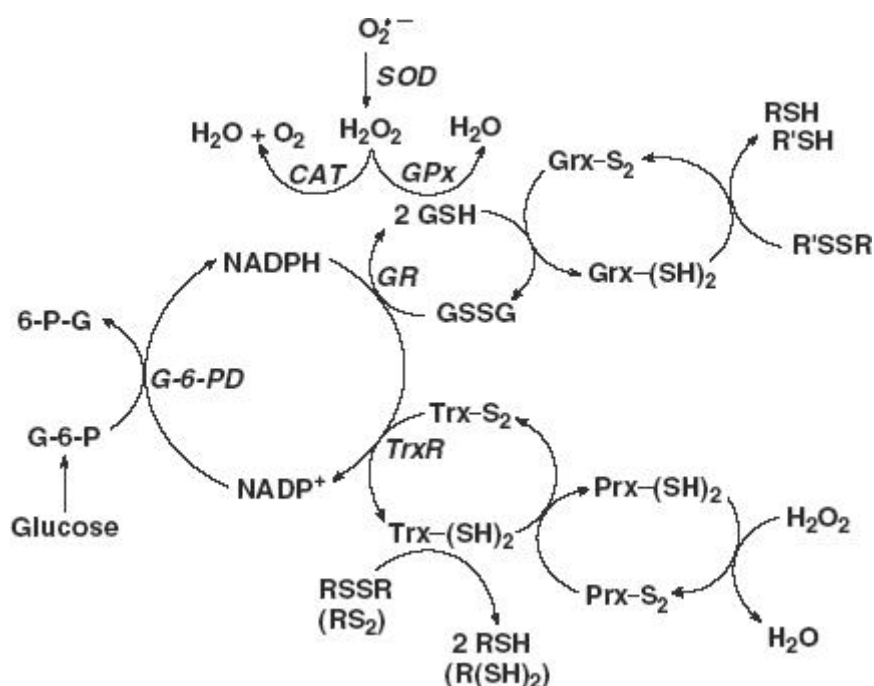
**Obrázek 2** - Přeměna oxidovaného thioredoxinu na redukovaný za účasti thioredoxin reduktasy

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).

Společné znaky thioredoxinového a glutathionového systému jsou: (a) oba enzymy patří do stejné rodiny oxidoreduktas; (b) substrátem pro oba enzymy je malý redox-aktivní peptid (thioredoxin respektive glutaredoxin); (c) u obou enzymů probíhají redox reakce na disulfidu.

Rozdíly spočívají v: (a) omezené substrátové specifitě glutathion reduktasy, která redukuje jen glutathion; (b) vysoké hladině redukovaného glutathionu v buňce, který odstraňuje elektrofilní částice spontánně nebo za katalýzy glutathion transferasou.

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



**Obrázek 3** - Systém zachytávání volných radikálů, jehož součástí je thioredoxinový a glutathionový systém. (Ng CF et al., 2007)

První savčí TrxR byla získána z lidské placenty a byla to TrxR-1. Bylo zjištěno, že pouze 31% sekvence bylo obdobné jako u prokaryotických thioredoxin reduktas a 44% se shodovalo s eukaryotickými a prokaryotickými glutathion reduktasami (Gasdaska PY et al., 1995). Katalytické místo lidské TrxR, -Cys-Val-Asn-Val-Cys-Gly-, se taktéž nalézá v lidské GR. Je umístěno ve FAD doméně těchto enzymů (Gasdaska PY et al., 1995, Russel and Model, 1988).

Předpokládaná molekulární hmotnost monomeru lidské TrxR-1 je 54,6 kDa. V původně získané lidské placentární TrxR-1 se předpokládalo, že C-terminální aminokyselinová sekvence je -Gly-Cys (Gasdaska PY et al., 1995). Následné výzkumy TrxR-1, získané z A549 buněk karcinomu plic u lidí, ukázaly, že C-terminální sekvence je -Gly-Cys-Gly-SeCys (kde SeCys je selenocystein). Tím se zjistilo, že lidská TrxR-1 je selenoprotein (Tamura and Stadtman, 1996). Ve své molekule obsahují 2 selenocysteiny. Pouze savčí thioredoxin reduktasy jsou selenoenzymy (Gasdaska JR et al., 1996).

Formy:

- **TrxR-1**

Tato forma je předmětem našeho výzkumu. Nachází se v cytosolu buněk. Slouží jako ochrana proti oxidačnímu stresu tím, že redukuje thioredoxin, který se oxiduje vycytáváním volných radikálů. Velmi často je spojována s nádorovými buňkami z hlediska růstu a programované smrti buňky. V nádorových buňkách je aktivita zvýšena, což je u některých druhů tohoto onemocnění potlačováno  $As_2O_3$  a vede k následnému zániku buňky (Lu, 2007). Nicméně  $As_2O_3$  je toxická látka pro celý organismus. Tomu by se dalo předejít použitím olivového oleje místo  $As_2O_3$ . Olivový olej blokuje aktivitu TrxR-1 (viz. kap. 5.1, str. 37) a není toxický pro organismus. TrxR může sloužit jako cílový enzym pro chemoterapeutika ( $As_2O_3$ , sloučeniny Pt).

- **TrxR-2**

Druhá lidská TrxR byla získána nedávno (Gasdaska PY et al., 1999, Miranda-Vizuite et al., 1999). Má 84 % podobnost sekvence s TrxR-1. Navíc je TrxR-2 rozšířena o dalších 33 aminokyselin na N-terminálním konci, které byly identifikovány jako importovaná mitochondriální sekvence. TrxR-2 se nachází v mitochondriích (Miranda-Vizuite et al., 1999). Funkce TrxR-2 je zatím neznámá, ale předpokládá se, že může hrát roli při ochraně buněk proti mitochondriemi zprostředkovanému oxidačnímu stresu. Je to myšlenka, která souvisí s nedávným nálezem unikátní mitochondriální formy thioredoxinu (Spyrou et al., 1997).

- **TrxR-3**

V organismu se vyskytuje ještě jeden známý druh TrxR, a to TrxR-3. Nachází se v *testes*. Není dosud plně prozkoumána. Od předchozích dvou isoenzymů se liší tím, že na N - konci má glutaredoxinovou doménu, což tomuto enzymu umožňuje chovat se jako TrxR i jako GR. Důležitou roli zastává při dozrávání spermií.

Katalytický mechanismus TrxR je jako u všech enzymů ovlivněn jejím prostorovým uspořádáním. Značně studován byl katalytický mechanismus TrxR *E. Coli* (Russel and Model, 1988, Waksman et al., 1994, Arscott et al., 1997, Lennon and Williams, 1997).

Savčí thioredoxin reductasy sdílí vyšší stupeň sekvenční identity a mechanických vlastností s GR, než s TrxR *E. Coli* (Gasdaska PY et al., 1995, Gladyshev et al., 1996,

Arscott et al., 1997). U glutathion reductasy je FAD doména a NADPH doména v těsné blízkosti, což umožňuje elektronům přecházet z NADPH na isoalloxazinový kruh FAD, aniž by došlo k významným konformačním změnám enzymu v aktivní centru (Rietveld et al., 1994).

Titrace lidské TrxR s disiřičitanem ukázala přítomnost dalšího aktivního centra, které se v glutathion reductase nenachází (Arscott et al., 1997). Jak bylo uvedeno výše, TrxR-1 má na C-konci SeCys zbytek, který je nutný pro katalytickou činnost, ale není součástí chráněného aktivního centra. Všechny ostatní savčí selenoproteiny, u kterých je známa funkce, jsou enzymy se SeCys v chráněném aktivním centru (Low and Berry, 1996).

Savčí thioredoxin reductasy jsou rozmanité enzymy schopné redukce thioredoxinů různého druhu (Oblong et al., 1993, Holmgren, 1977). Je možné, že to je C-terminální katalytický SeCys, co způsobuje širokou substrátovou specifitu TrxR (Gromer et al., 1998), což enzymu umožňuje redukovat jak objemné, tak malé molekuly proteinů. Navržený katalytický mechanismus lidské TrxR je, že C-konec je flexibilní, což umožňuje složce -Cys-SeCys-Gly provádět redukci substrátu stejně, jako na chráněném aktivním místě Cys zbytky (Gromer et al., 1998).

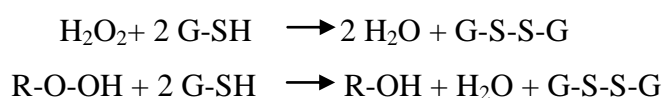
Při studiu TrxR je důležité zaměřit se na její inhibitory, kterých je celá řada. Ve skutečnosti, se mnoho látek používaných v klinické praxi, ukázalo být inhibitory TrxR. Některé příklady jsou uvedené v následující tabulce.

**Tabulka 1** – Vybrané inhibitory thioredoxin reduktasy

Chemické zařazení	Sloučenina
sloučeniny platiny	cisplatina
	oxaliplatina
sloučeniny zlata	auranofin
	aurothioglukosa
nitrosomočovina	carmustin
alkylující látky	busulfan
	chlorambucil
	melphalan
sloučeniny fosfamidů	ifosfamid
	cyklofosfamid
sloučeniny arsenu	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
anthracykliny	daunorubicin
	doxorubicin
flavonoidy aj.	myricetin
	quercetin
	resveratrol
	curcumin

### 2.1.2 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a z něj vzniklé hydroxylové radikály (·OH), které jsou vysoce reaktivní. GPx katalyzují rozklad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a hydroperoxidů mastných kyselin (ROOH) pomocí GSH, který slouží jako donor elektronu. Produkty této reakce jsou příslušné alkoholy a voda:



Tyto reakce brání hromadění peroxidu vodíku a hydroperoxidů mastných kyselin, které vznikají při oxidativním odbourávání lipidů. Po odstranění hydroperoxidové skupiny mohou být hydroxylované lipidy normálně metabolizovány β-oxidací. Redukovaný glutathion je regenerován NADPH za katalýzy glutathion reduktasy (GR):



Glutathion peroxidasa je nepostradatelnou složkou antioxidačního systému v organismu, protože katalyzuje redukci lipoperoxidů a peroxidů vodíku, které jsou normálně tvořeny v průběhu metabolických dějů.

GPx je součástí glutathionového systému, který následně zahrnuje glutathion, glutathion reduktasu a glutathion S-transferasu.

Formy:

- **Cytosolová glutathion peroxidasa (GPx-1)**

Byla objevena v roce 1973 během zkoumání faktorů, které chrání erytrocyty proti oxidačnímu poškození. Je to také první objevený protein obsahující selen. Redukuje  $H_2O_2$  i organické peroxidy v buněčném cytosolu a v mitochondriální matrix (Günzler et al., 1974).

- **Gastrointestinální glutathion peroxidasa (GPx-2)**

GPx-2 byla nejprve identifikována v lidských játrech, ale nedávno byla objevena ve střevech krys. Tato peroxidasa chrání střevní buňky před vnějšími peroxidy a xenobiotiky z potravy (Chu et al., 1993).

- **Plasmatická glutathion peroxidasa (GPx-3)**

GPx-3 je vylučována především v ledvinách. Je také hlavním zdrojem selenu v mateřském mléce. Funkce této peroxidasy je nejasná, zřejmě chrání intracelulární prostory především v ledvinách (Takahashi et al., 1987).

- **Fosfolipid hydroperoxidová glutathion peroxidasa (PHGPx, GPx-4)**

Ve velkém množství se vyskytuje ve spermích a *testes*. PHGPx je důležitý strukturální protein nezbytný pro integritu spermií. Při jeho nedostatku dochází k mužské infertilitě. Je podstatně více rezistentní vůči nedostatku selenu než ostatní GPx (Schneider et al., 2009).

- **Epididymální sekreční glutathion peroxidasa (GPx-5)**

Nachází se v savčím samčím (mužském) pohlavním ústrojí (Hall et al., 1998).

- **GPx-6, GPx-7, GPx-8**

Tyto tři poslední glutathion peroxidasy nejsou příliš prozkoumány. Předpokládá se, že mají obdobnou funkci jako ostatní GPx, tedy detoxikace organismu od peroxidů (Kryukov et al., 2003, Utomo et al., 2004, Toppo et al., 2008).

## 2.2 Studované látky

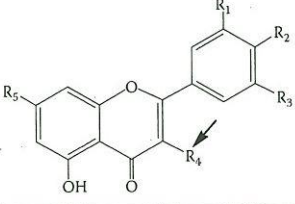
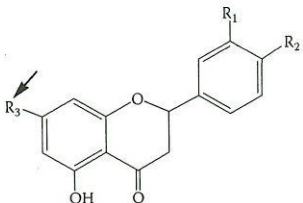
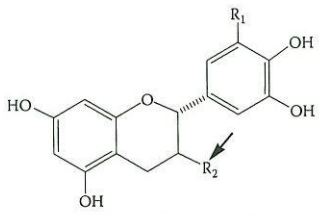
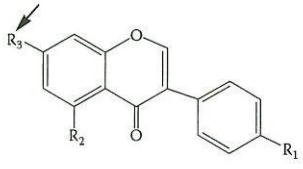
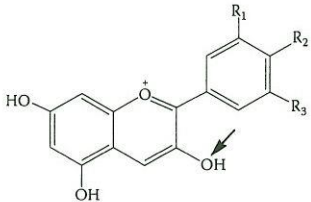
V našich pokusech jsme zkoumali přírodní látky flavonoidy. Tyto látky jsou velmi početnou skupinou. Je známo přes 4000 látek, které se řadí do této skupiny. Během současné doby jsou objevovány další molekuly řadící se mezi flavonoidní látky.

Základní stavební jednotkou flavonoidů je flavan. Jedná se o heterocyklické sloučeniny, obsahující dvě benzenová jádra, spojena heterocyklickým pyranem. Bývají různě substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, přičemž jednotlivé deriváty jsou rozlišovány pouze stupněm substituce a oxidace. Hlavní skupiny flavonoidů nazývají *flavanoly*, *flavanony*, *flavony*, *flavonoly*, *antokyanidiny*, *proantokyanidiny* a *isoflavonoidy* (Obrázek 4, str. 23).

Nejčastěji se přírodní flavonoidy vyskytují ve formě O-glykosidů. Ve své molekule mají obsaženou nesacharidovou část (aglykon) a sacharidovou složku. Jejich výskyt v organismu je důležitý pro antioxidační systém. Zabraňují např. peroxidaci lipidů, vychytávají volné kyslíkové radikály, vážou na sebe některé prooxidačně působící ionty kovů (např. Fe či Cu) apod. Zjistilo se, že přírodní flavonoidy mohou účinně působit preventivně u chorob, které mají původ v oxidačním poškození tkání (kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza,...).

Nejběžnější flavonoid ve výživě člověka je *flavonol* quercetin. Nachází se ve vysokých koncentracích v běžných potravinách, např. černý a zelený čaj, cibule, jablka, kapusta a červené víno. Mezi *flavanoly* jsou hlavní skupinou catechiny (catechin, epicatechin, epigallocatechin) a jejich estery s kyselinou galovou. Nacházejí se hlavně v čaji, červeném víně a čokoládě. *Proantokyanidiny* jsou flavanoly s polymerní strukturou. Mohou se vyskytovat jako směs polymerů, estery kyseliny galové nebo ve formě dimerů. Jejich struktura je značně složitá. Vykazují adstringentní účinky. Zdrojem jsou např. hrozny, jablka, červené víno, čokoláda, čaj. *Antokyanidiny* jsou složkou červených barviv např. v borůvkách, třešních, švestkách, rybízu. Tzv. „citrusové“ flavonoidy jsou *flavanony*. Tento název souvisí s jejich typickým výskytem v pomerančích a grapefruitech. Jedná se především o naringenin, hesperetin a jejich glykosidy. *Isoflavonoidy* jsou zvláštní skupinou flavonoidů. Mezi jejich hlavní zástupce patří isoflavony genistein a daidzein. Vyskytují se především v luštěninách (sója) (Meskin et al., 2008).



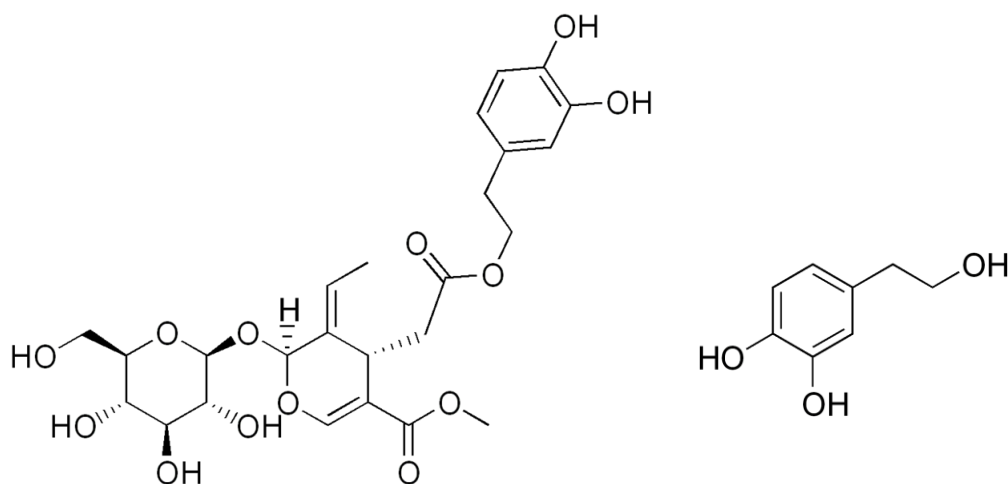
Group	Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Flavonols 	Quercetin	OH	OH	H	OH	OH
	Kaempferol	H	OH	H	OH	OH
	Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH
	Morin	OH	H	OH	H	OH
	Isorhamnetin	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH	OH
	Quercitrin	OH	OH	H	O-rham	OH
	Rutin	OH	OH	H	O-rut	OH
Flavanones 	Naringenin	H	OH	OH		
	Naringin	H	OH	O-neo		
	Narirutin	H	OH	O-rut		
	Hesperidin	H	OCH <sub>3</sub>	O-rut		
	Hesperitin	H	OCH <sub>3</sub>	OH		
	Neohesperidin	OH	OCH <sub>3</sub>	O-neo		
	Didymin	H	OCH <sub>3</sub>	O-rut		
	Prunin	H	OH	O-glu		
Flavan-3-ols 	(+)-Catechin	H	OH			
	(-)-Epicatechin	H	OH			
	(-)-Epicatechin gallate	H	O-gall			
	(-)-Epigallocatechin	OH	OH			
	(-)-Epigallocatechin gallate	OH	O-gall			
Isoflavones 	Daidzein	OH	H	OH		
	Daidzin	OH	H	O-glu		
	Genistein	OH	OH	OH		
	Genistin	OH	H	O-glu		
	Formononetin	OCH <sub>3</sub>	H	OH		
	Biochanin A	OCH <sub>3</sub>	OH	OH		
	Ononin	OCH <sub>3</sub>	H	O-glu		
	Sissotrin	OCH <sub>3</sub>	OH	O-glu		
Anthocyanins 	Pelargonidin	H	OH	H		
	Cyanidin	OH	OH	H		
	Delphinidin	OH	OH	OH		
	Peonidin	OCH <sub>3</sub>	OH	H		
	Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	OH		
	Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>		

Notes: Rham, rhamnose; neo, neohesperidise, rhamnosyl-( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)-glucoside; rut, rutinoside, rhamnosyl-( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-glucoside; gall, gallic acid; glu, glucose; arrows represent a major position of glycosylation.

Obrázek 4 - Přehled skupin flavonoidů (Meskin et al., 2008).

### 2.2.1 Oleuropein a hydroxytyrosol: složky olivového oleje

Oleuropein (OLEU; (4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-2-oxoethyl]-5-ethylidene-6-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-tetrahydropyranyl]oxy]-4H-pyran-3-karboxylová kyselina, methyl ester) a hydroxytyrosol (HT; 3,4-dihydroxyphenylethanol), dvě hlavní účinné látky z olivovníku evropského (*Olea europaea*).



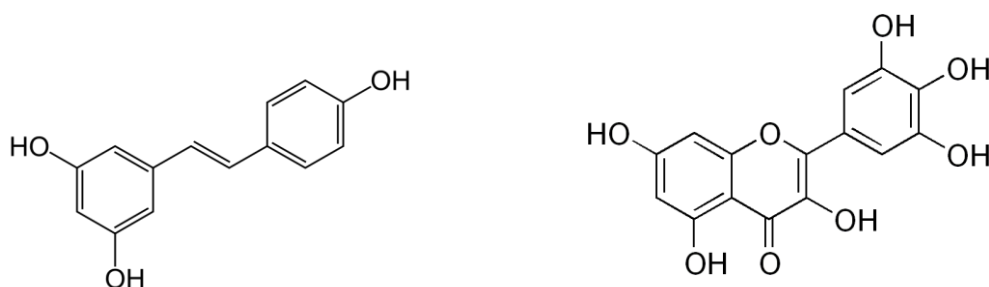
**Obrázek 5** – Struktura oleuropeinu (vlevo) a hydroxytyrosolu (vpravo)

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 listích olivovníků a v dalších rostlinách z čeledi olivovitých, například v jasaněch (*Fraxinus sp.*) a šejčících (*Syringa sp.*). Způsobuje typickou hořkost olivového oleje. V panenském olivovém oleji je ho 2 – 10 mg/l, celková koncentrace fenolických látek dosahuje 800 – 1000 mg/l. 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).

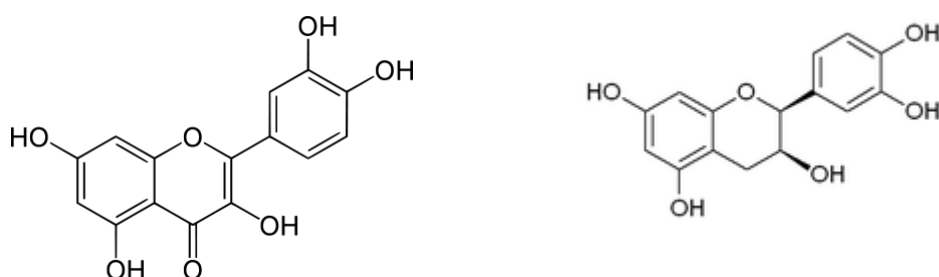
Hydroxytyrosol, jehož prekurzor je již zmíněný oleuropein, je také velmi účinný antioxidant. Nacházejí se společně v olivovém listí a plodech. V čisté formě to je kapalina bez chuti a zápachu. Má mj. imunostimulační a antibakteriální účinky (Granados-Principal et al., 2010).

## 2.2.2 Resveratrol, myricetin, quercetin a epicatechin

Mezi hlavní účinné látky červeného vína se řadí resveratrol (RSV; 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilben), myricetin (MYR; 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4-chromenon), quercetin (QUE; 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-on) a epicatechin (EPI; (2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2*H*-chromen-3,5,7-triol) (Paixão et al, 2008).



**Obrázek 6** – Struktura resveratrolu (vlevo) a myricetinu (vpravo)



**Obrázek 7** – Struktura quercetinu (vlevo) a epicatechinu (vpravo)

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 organismu, inhibuje koagulaci krevních destiček a má vliv na metabolismus lipidů. Resveratrol produkují některé rostliny při napadení bakteriemi či houbami - typ přirozené obrany (Soleas et al., 2001).

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).

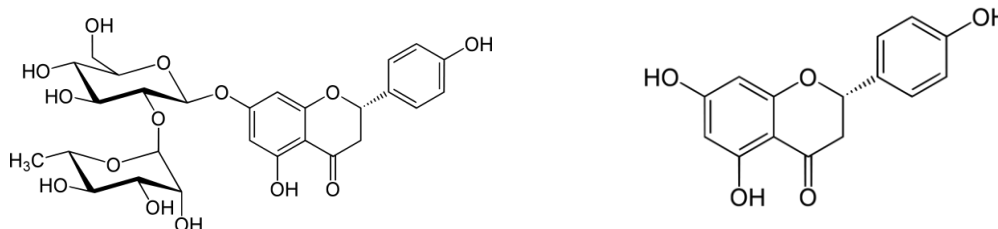
Quercetin je rostlinný flavonoid, známý pro své silné antioxidační a protizánětlivé účinky (tlumí tvorbu a uvolňování histaminu). Vyskytuje se v hroznech, černém a zeleném čaji, červené cibuli, bobulích (ostružiny či černý rybíz), atd (Lu J et al., 2006).

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).

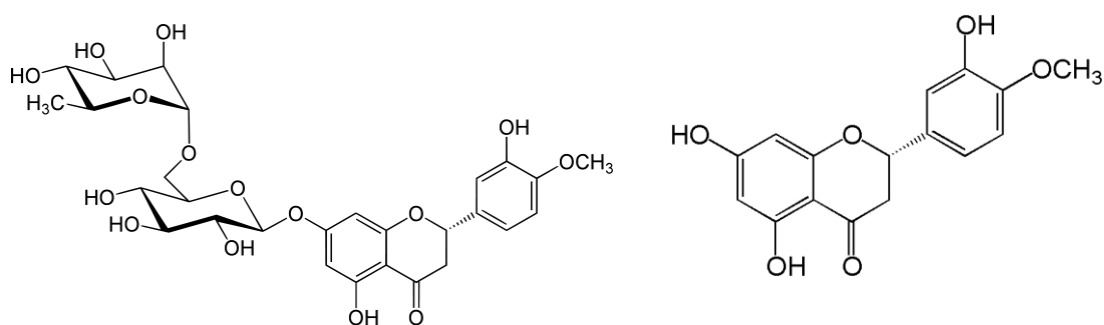
### 2.2.3 Naringin, naringenin, hesperidin a hesperetin

Ve šťávě z grapefruitu (*Citrus paradisi*) je obsaženo velké množství účinných látek jako např. vitamín C a B1, vápník, flavonoidy, glykosid naringin, kyselinu galakturonická a pektin (Rampersaud and Valim, 2015).

Pro naše experimenty jsme vybrali naringin (NAR; 7-[[2-O-(6-Deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]]oxy-2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on), naringenin (NRG; 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-on), hesperidin (HSP; (2S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-on) a hesperetin (HST; (S)-2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on).



**Obrázek 8** – Struktura naringinu (vlevo) a naringeninu (vpravo)



**Obrázek 9** – Struktura hesperidinu (vlevo) a hesperetinu (vpravo)

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 šťávy 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 naringeninu (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).

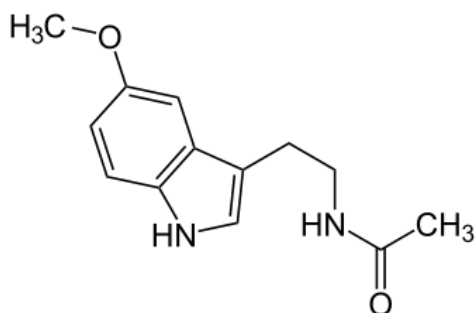
Flavonoid naringenin, který také způsobuje nahořklou chuť grapefruitů, je považován za účinný antioxidant a má podle některých odborníků přímo revoluční účinek na játra. Místo obvyklého ukládání tuku po jídle donutí játra tuk spalovat. Působí protizánětlivě a podporuje imunitní systém. Naringenin je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

## 2.2.4 Melatonin

Melatonin (ME; *N*-[2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl]ethanamid) je hormon, který je produkován epifýzou (nadvěškem mozkovým).



**Obrázek 10** – Struktura melatoninu

Hladina melatoninu je silně závislá na střídání světla a tmy. Během temnostní 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. cirkadiánní rytmy (Ilnarová 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).

Přítomnost melatoninu se totiž neomezuje jen na člověka či na obratlovce, ale je rozšířen v celé živočišné říši. Ve všech případech patrně slouží jako signál pro orientaci v čase. Nicméně i rostliny musí rovněž nějak měřit čas a chránit se před radikály. Dlouho se o obsahu melatoninu v rostlinách prakticky nevědělo, protože u rostlin byly objeveny a studovány jiné systémy měření času. Až začátkem devadesátých let našla skupina R. Hardelanda melatonin v jednobuněčné řase *Gonyaulax polyedra*. Jeho koncentrace má podobný denní rytmus s maximem v noci jako u živočichů. Hardelandova skupina tak

odkryla neprobádané pole nových poznatků v rostlinné fyziologii. Mimořádně důležitý je výskyt melatoninu u vyšších rostlin (Iriti et al., 2010).

Výzkum melatoninu u rostlin probíhá zatím poměrně málo. Nelze zatím s jistotou říci, je-li melatonin u rostlin jen bezvýznamným vedlejším produktem metabolismu, nebo zda kontroluje klíčové životní procesy jako u člověka.

### 2.2.5 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  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . Redox potenciál vzájemného přechodu výše zmíněných iontů leží v oblasti, která umožňuje současnou existenci obou forem vedle sebe. Železo se dále vyskytuje v oxidačním stavu  $Fe^{4+}$  a  $Fe^{6+}$ . Sloučeniny těchto oxidačních stupňů železa nejsou příliš stabilní.

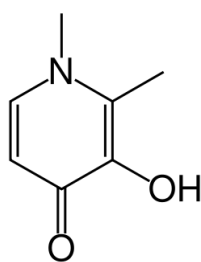
Železo patří mezi tzv. mikrobiogenní prvky, které tvoří obvykle méně než 0,005 % hmotnosti. V lidském těle se nachází asi 3 - 4 g železa.

Doporučená denní dávka je 20 mg. Minimální denní přísun železa nezbytný pro tvorbu červených krvinek je 10 - 15 mg. 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).

### 2.2.6 Deferipron (L1)

Deferipron (L1, 3-hydroxy-1,2-dimethylpyridin-4(1*H*)-on, Ferriprox®) je účinný chelátor železa. Tedy dokáže na sebe navázat ionty tohoto kovu a odstranit je tak z organismu. 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.



**Obrázek 11** – Struktura deferipronu (L1)

### 2.2.7 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 antioxidačního 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 ( $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ) 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:

- vzorky pro stanovení hladiny GSH byly vkládány do kádinky s ledovým roztokem 0,02 M EDTA a vzápětí analyzovány

- ostatní vzorky byly propláchnuty v 0,9 %  $\ominus$  chloridu sodného, zamrazeny na  $-20\text{ °C}$  a poté až do analýzy uchovávány při teplotě  $-70\text{ °C}$ .

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

#### 4.2.1 Thioredoxin reduktasa

Tento enzym je známý v několika formách, které se odlišují místem výskytu v organismu (popsáno výše – kap. 2.1.1, str. 17).

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 redukcí 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).

#### **4.2.2 Glutathion peroxidasa**

Tento enzym je známý v několika formách, které se odlišují místem výskytu v organismu (popsáno výše – kap. 2.1.2, str. 21).

V našich pokusech jsme stanovovali GPx-1 [EC 1.11.1.9], která se nachází v cytosolu buňky. Účastní se redukcí 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  $\text{NADP}^+$  (Günzler et al., 1974).

#### **4.2.3 Glutathion reduktasa**

Glutathion reduktasa [EC 1.6.4.2] katalyzuje redukcí 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 redukcí DTNB (Smith et al., 1988).

#### **4.2.4 Katalasa**

Tento enzym [EC 1.11.1.6] má čtyři podjednotky, každá z nich obsahuje prostetickou porfyrinovou skupinu obsahující ion  $\text{Fe}^{3+}$ . 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.

#### **4.2.5 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).

#### **4.2.6 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.

#### **4.2.7 Superoxid dismutasa**

Role superoxid dismutasy [EC 1.15.1.1] v organismu je urychlit dismutaci (zhašení) toxického superoxidového radikálu ( $O_2^-$ ), 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*

Zjištění z tohoto pokusu byla zveřejněna na konferenci SFRR - E Meeting 2010 (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).

V této sérii pokusů byl sledován vliv vybraných látek z olivovníku evropského (*Olea europaea*) na oxidační stres. Tyto látky byly oleuropein a hydroxytyrosol.

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**

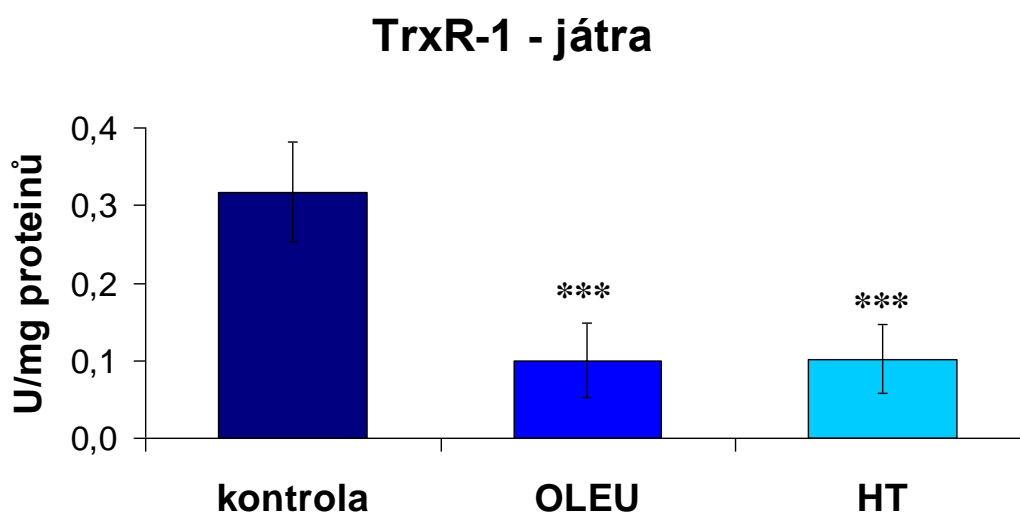
V jaterní tkáni došlo po aplikaci OLEU ke snížení aktivity TrxR-1, GPx-1 a GR o 68,6 % ( $p < 0,001$ ), 7,0 % ( $p < 0,001$ ) a 5,2 % ( $p < 0,05$ ) a vlivem HT o 67,9 % ( $p < 0,001$ ), 5,6 % ( $p < 0,001$ ) a 16,5 % ( $p < 0,001$ ). Hladina GSH byla zvýšena HT o 9,2 % ( $p < 0,05$ ). Hladina LP zůstala beze změny. (Graf 1, 2, 3, 4, 5, str. 38 - 40)

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. (Graf 6, 7, 8, 9, 10, str. 41 - 43)

## 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.



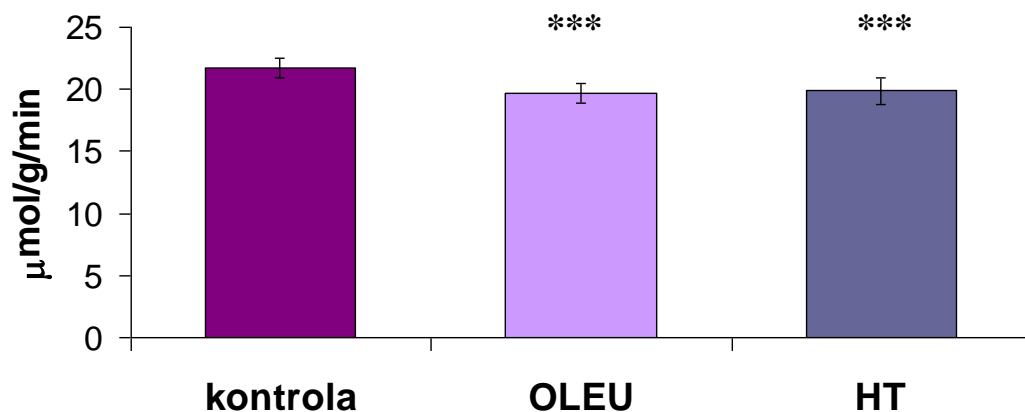
**Graf 1 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na aktivitu thioredoxin reduktasy (TrxR-1) ve tkáni jater potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD.

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



## GPx-1 - játra

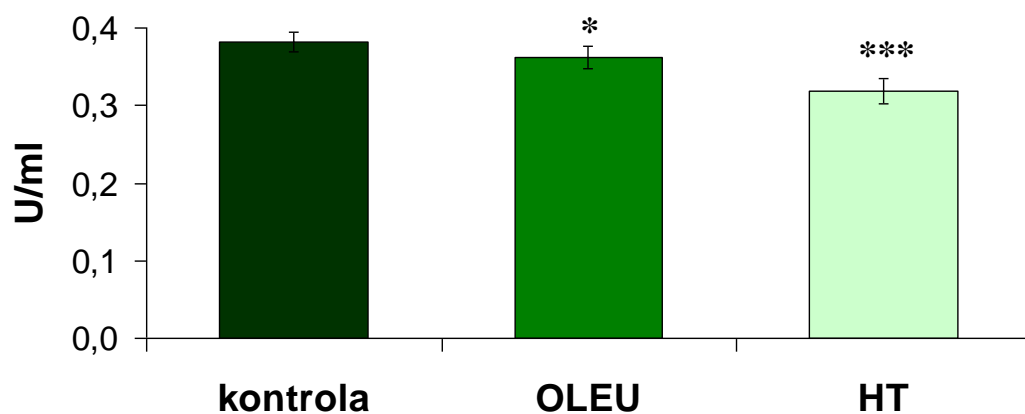


**Graf 2 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni jater potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD.

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

## GR - játra

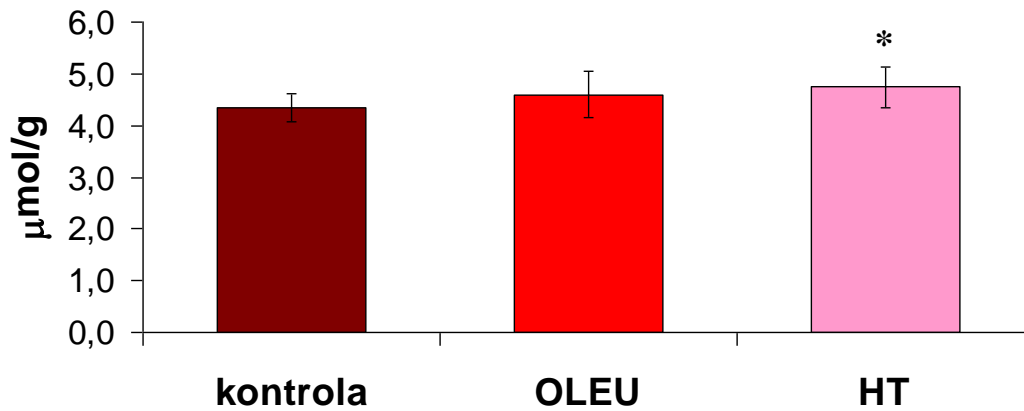


**Graf 3 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na aktivitu glutathion reductasy (GR) ve tkáni jater potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD.

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

### GSH - játra

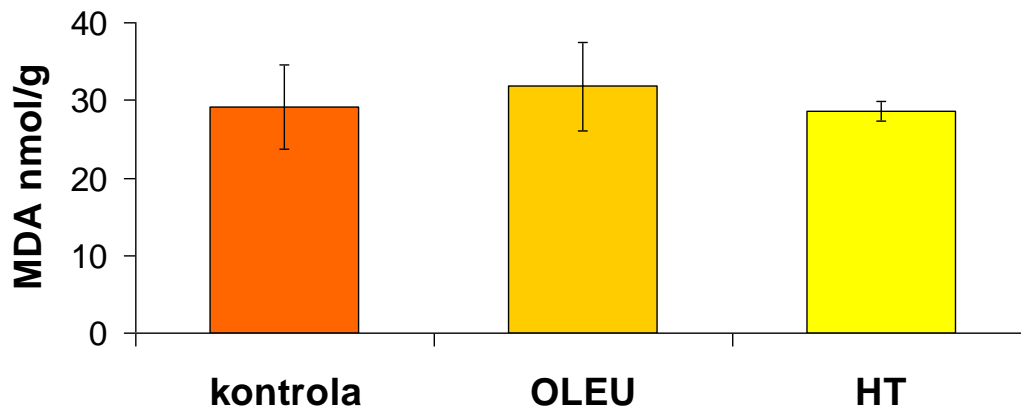


**Graf 4 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na hladinu redukováného glutathionu (GSH) ve tkáni jater potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

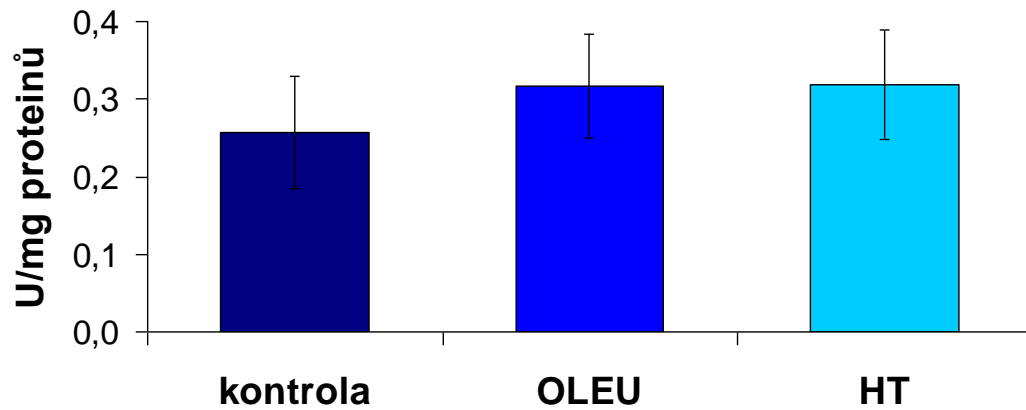
### LP - játra



**Graf 5 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni jater potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

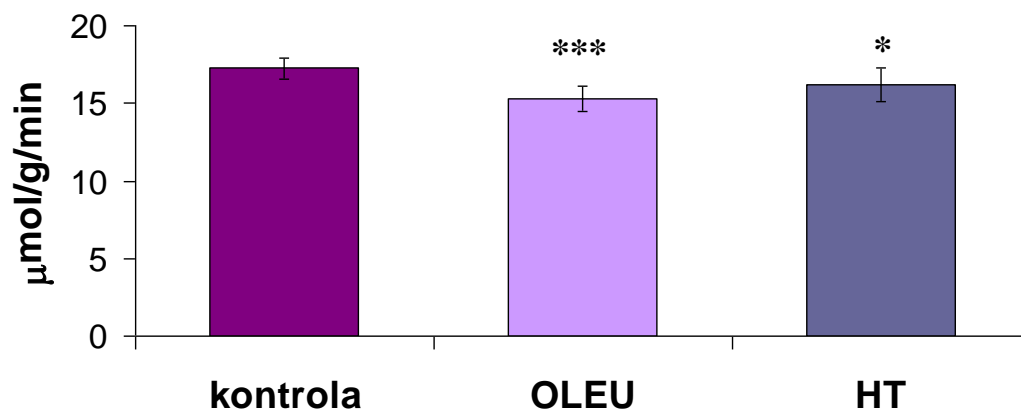
### TrxR-1 - ledviny



**Graf 6 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na aktivitu thioedoxin reduktasy (TrxR-1) ve tkáni ledvin potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

### GPx-1 - ledviny

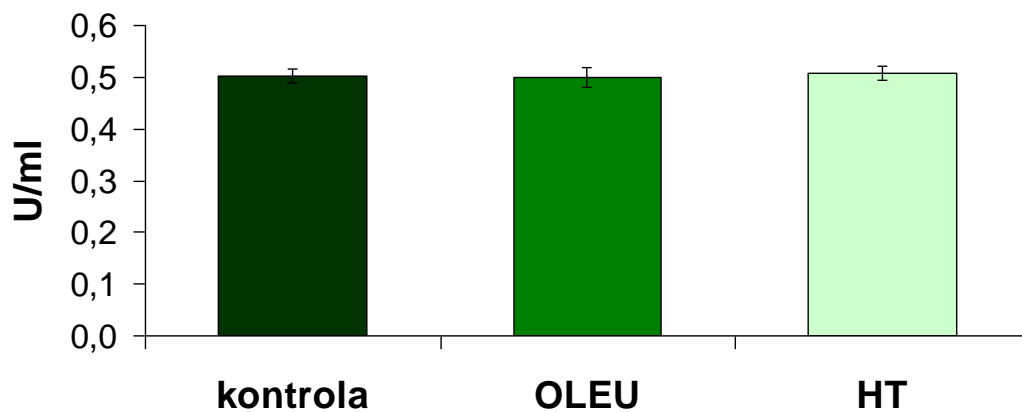


**Graf 7 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni ledvin potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

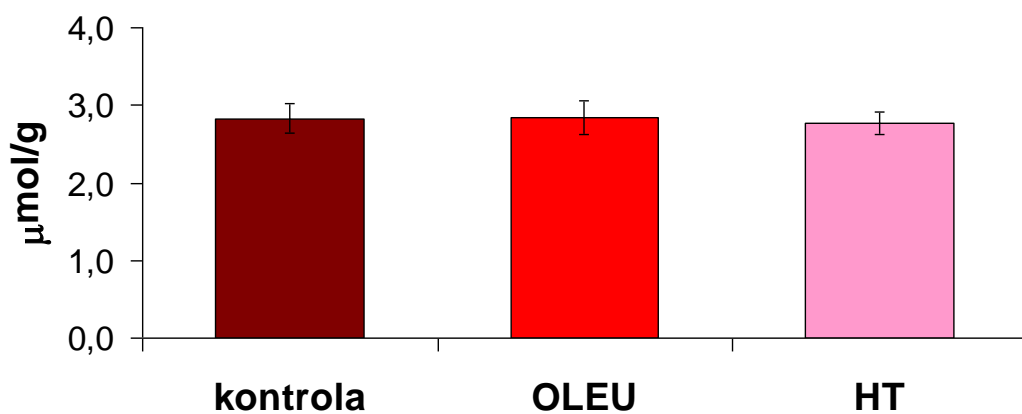
### GR - ledviny



**Graf 8 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na aktivitu glutathion reduktasy (GR) ve tkáni ledvin potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

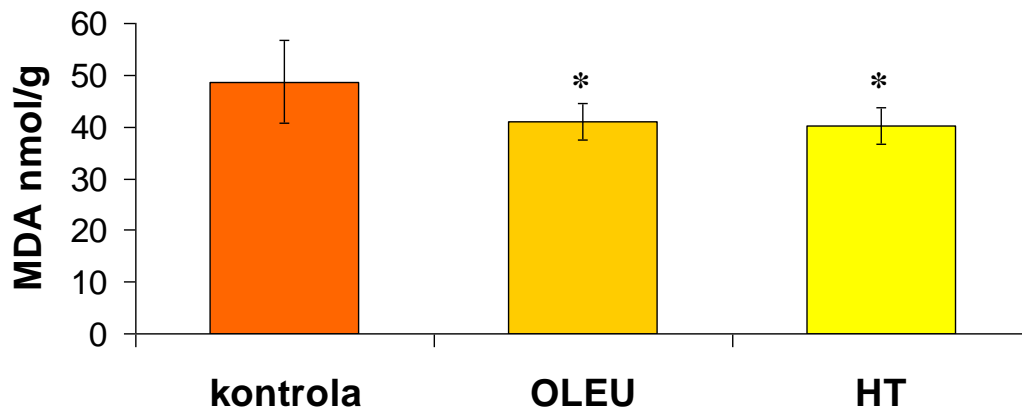
### GSH - ledviny



**Graf 9 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na hladinu redukovaného glutathionu (GSH) ve tkáni ledvin potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

## LP - ledviny



**Graf 10 - Vliv oleuropeinu (OLEU) a hydroxytyrosolu (HT) na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni ledvin potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

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

Zjištění z tohoto pokusu byla zveřejněna na konferenci SFRR - E Meeting 2011 (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).

V této sérii pokusů byl sledován vliv vybraných látek (resveratrol, myricetin, epicatechin a quercetin) z červeného vína na oxidační stres.

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.

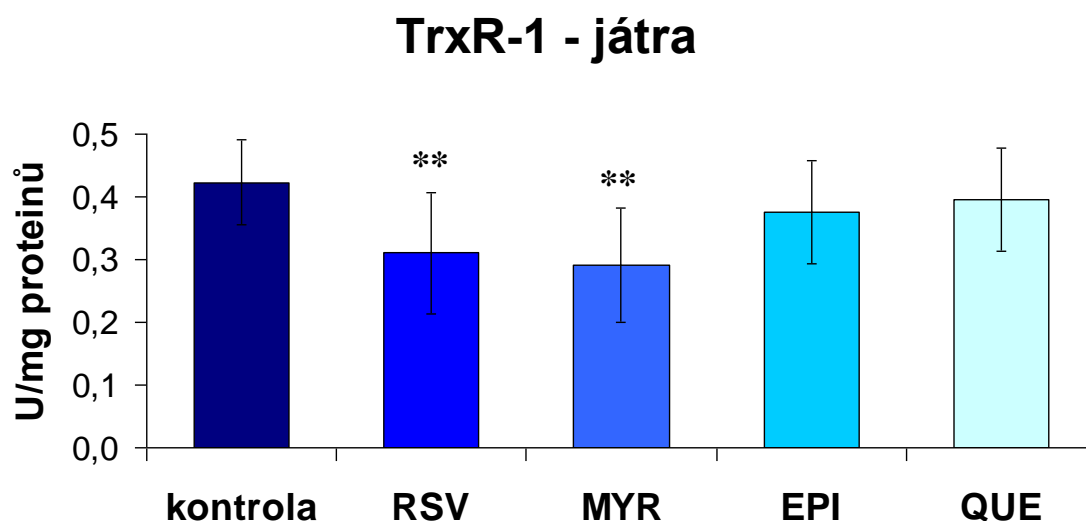
### **Výsledky**

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). (Graf 11, 12, 13, 14, 15, str. 45 - 47)

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). (Graf 16, 17, 18, 19, 20, str. 48 - 50)

## Závěr

Polyfenoly z červeného vína (RSV, MYR, EPI a QUE) významně 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 antioxidantní, ale i případně protinádorové účinky. Mechanismus tohoto účinku bude souviset s thioredoxinovým systémem. Epicatechinem a quercetinem byla snížena aktivita GPx-1 a GR.



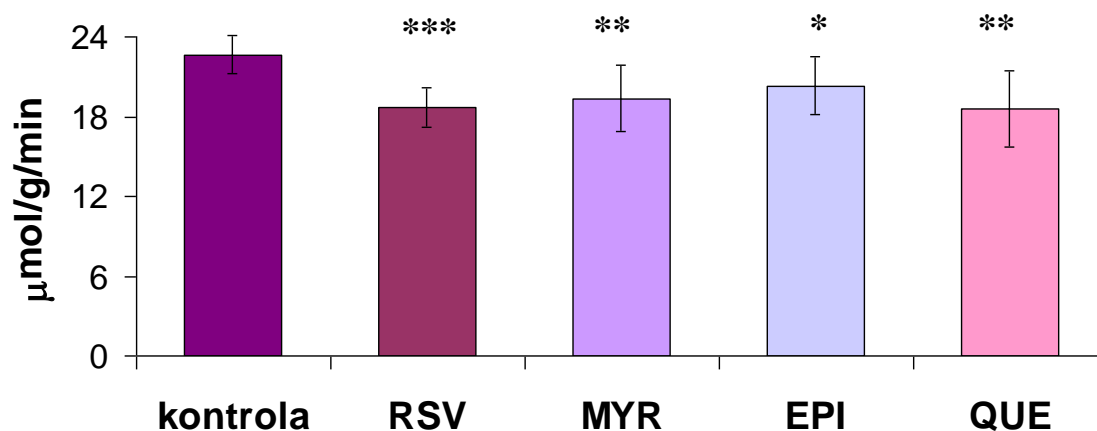
**Graf 11 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na aktivitu thioredoxin reductasy (TrxR-1) ve tkáni jater potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## GPx-1 - játra



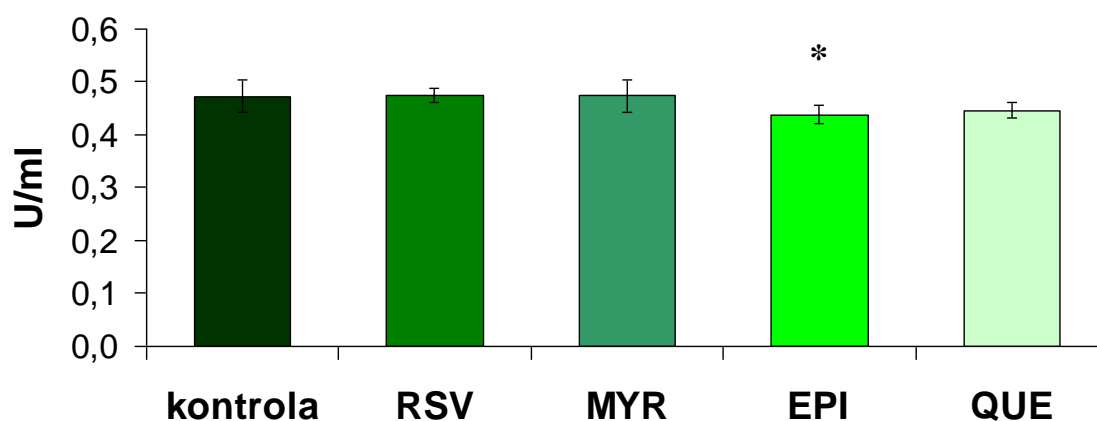
**Graf 12 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni jater potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## GR - játra



**Graf 13 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na aktivitu glutathion reduktasy (GR) ve tkáni jater potkanů.**

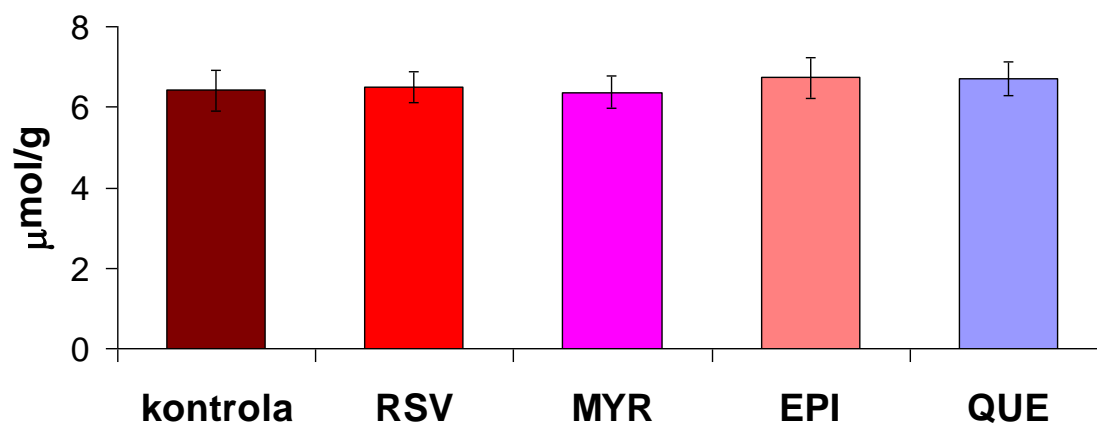
RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina



## GSH - játra

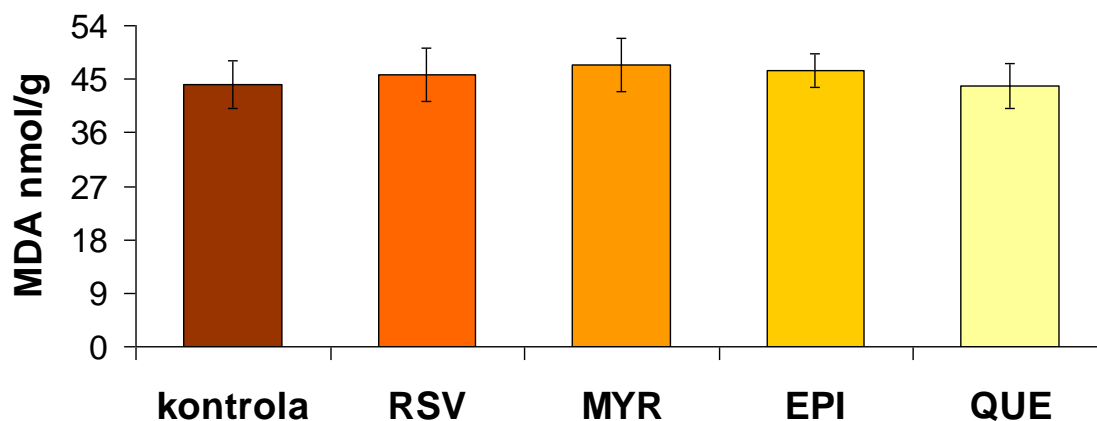


**Graf 14 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na hladinu redukovaného glutathionu (GSH) ve tkáni jater potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

## LP - játra

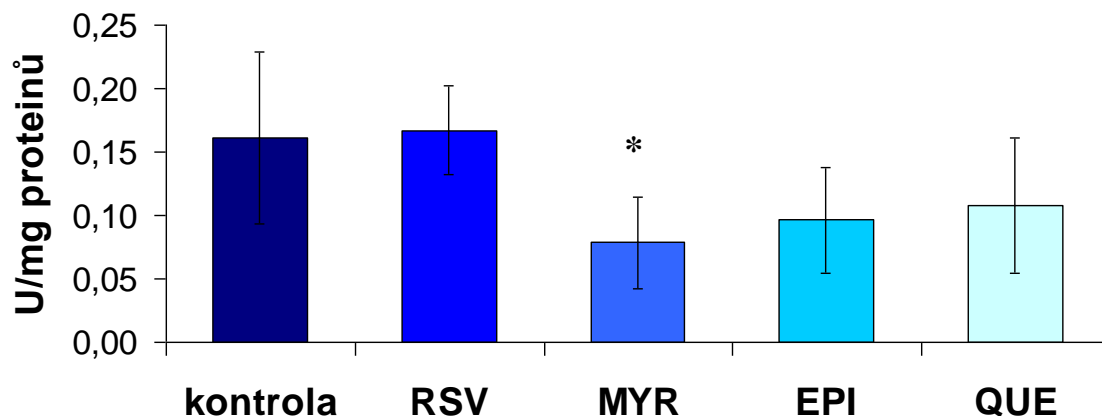


**Graf 15 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni jater potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

## TrxR-1 - ledviny



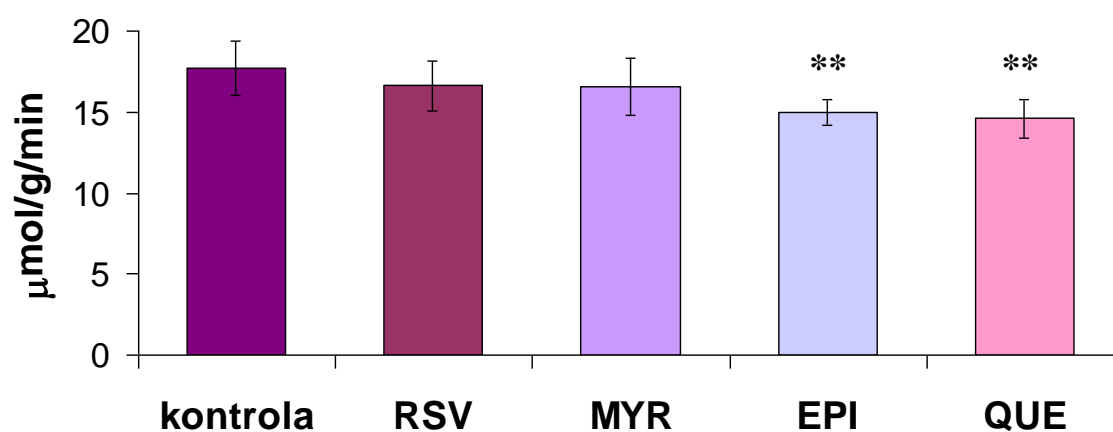
**Graf 16 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na aktivitu thioredoxin reduktasy (TrxR-1) ve tkáni ledvin potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

## GPx-1 - ledviny



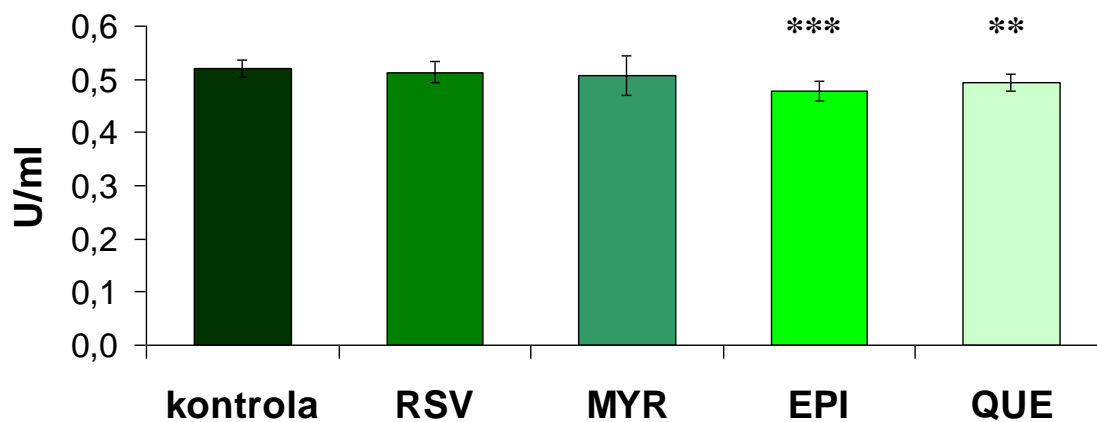
**Graf 17 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni ledvin potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## GR - ledviny



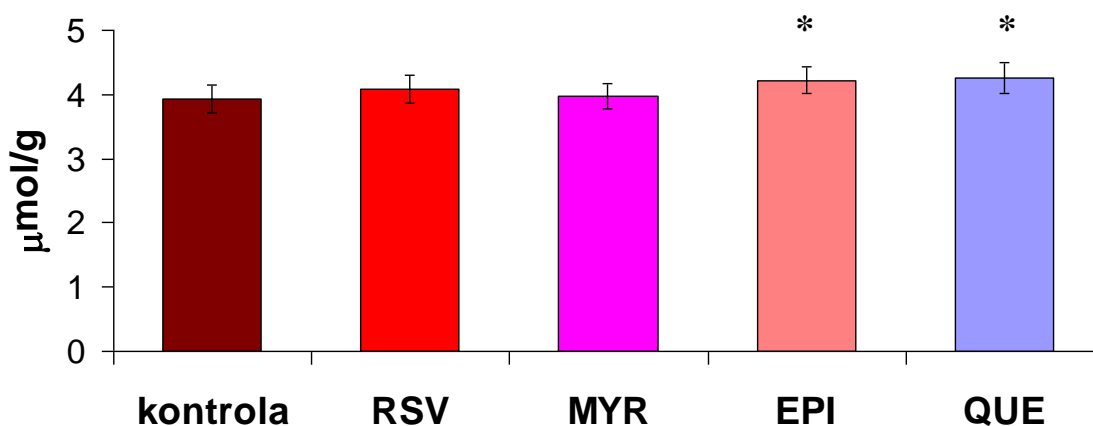
**Graf 18 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na aktivitu glutathion reduktasy (GR) ve tkáni ledvin potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## GSH - ledviny



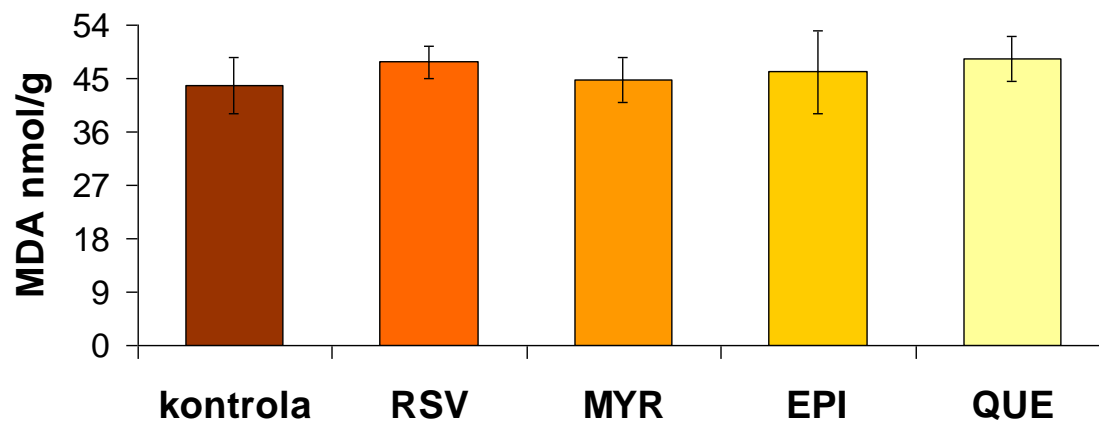
**Graf 19 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na hladinu redukováného glutathionu (GSH) ve tkáni ledvin potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\* p<0,05 vs. kontrolní skupina

## LP - ledviny



**Graf 20 - Vliv vybraných polyfenolů červeného vína na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni ledvin potkanů.**

RSV – resveratrol, MYR – myricetin, EPI – epicatechin, QUE – quercetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

Zjištění z tohoto pokusu byla zveřejněna na konferenci 59. Farmakologické dny 2009 (A. Hodková, D. Kotyzová, V. Eybl - Vliv citrusových flavonoidů na antioxidační status potkana v akutním pokusu. 59. Farmakologické dny, Bratislava, Slovensko, 2. - 4. 9. 2009, Sborník abstrakt).

V této sérii pokusů byl sledován vliv vybraných citrusových flavonoidů naringinu, naringenin, hesperidinu a hesperetinu na oxidační stres.

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.

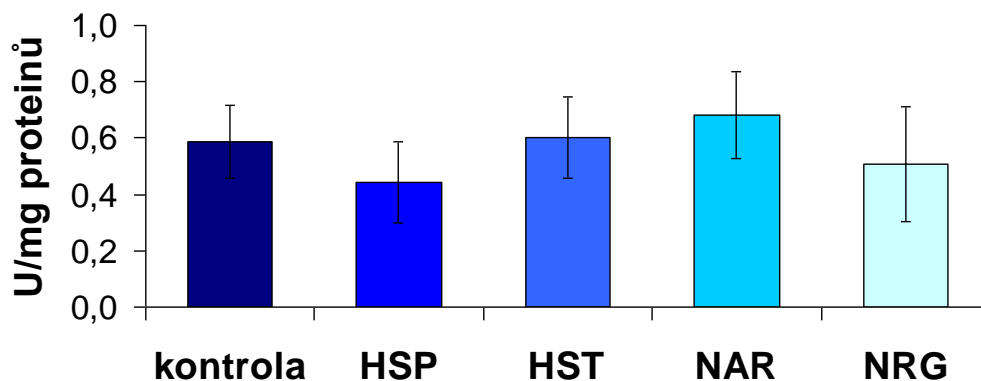
#### **Výsledky**

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. (Graf 21, 22, 23, 24, 25, 26, str. 52 - 54)

#### **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.

## TrxR-1 - játra

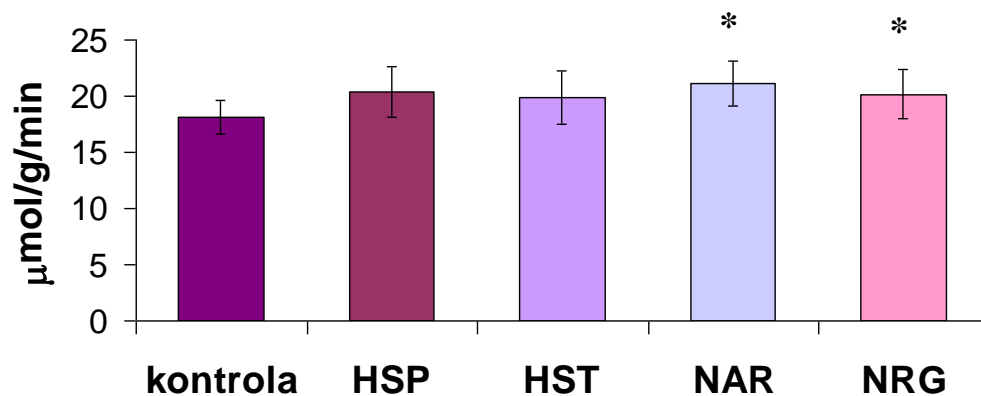


**Graf 21 - Vliv vybraných citrusových flavonoidů na aktivitu thioredoxin reduktasy (TrxR-1) ve tkáni jater potkanů.**

HSP – hesperidin, HST – hesperetin, NAR – naringin, NRG – naringenin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

## GPx-1 - játra



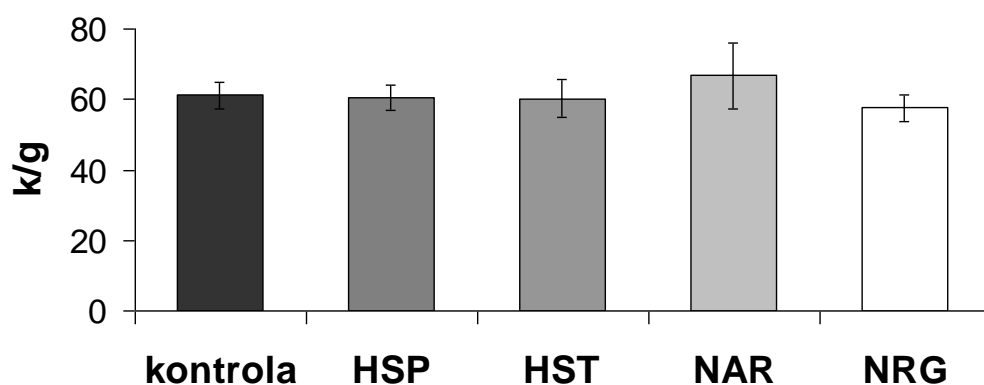
**Graf 22 - Vliv vybraných citrusových flavonoidů na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni jater potkanů.**

HSP – hesperidin, HST – hesperetin, NAR – naringin, NRG – naringenin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

## CAT - játra

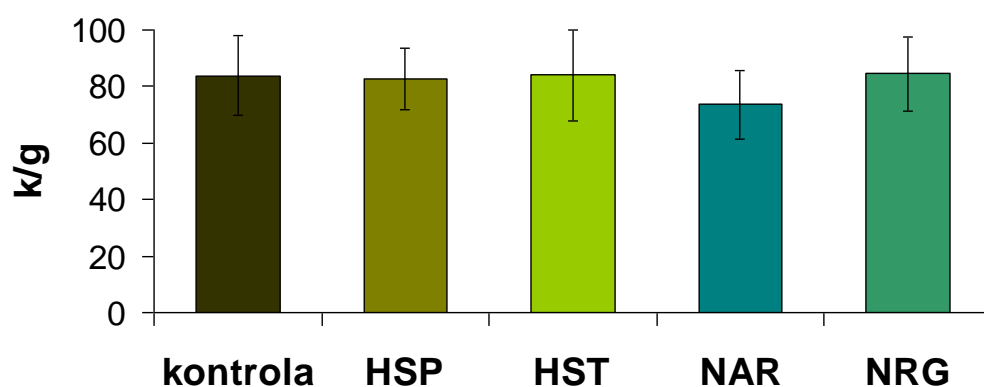


**Graf 23 - Vliv vybraných citrusových flavonoidů na aktivitu katalasy (CAT) ve tkáni jater potkanů.**

HSP – hesperidin, HST – hesperetin, NAR – naringin, NRG – naringenin

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD.

## SOD - játra

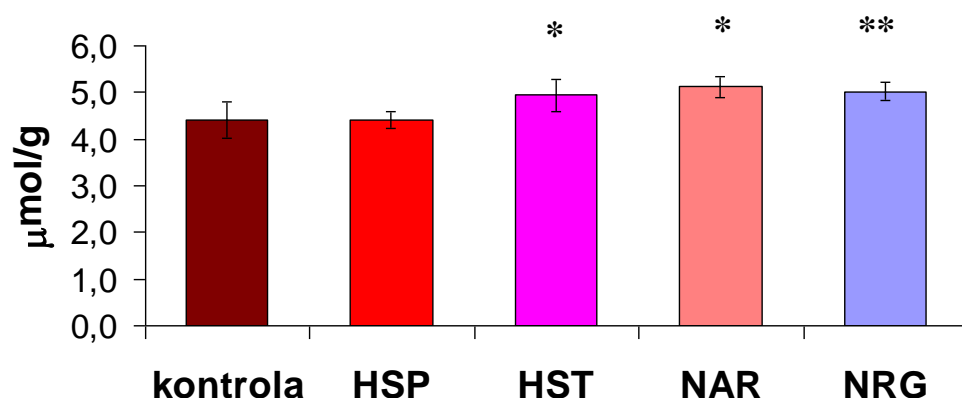


**Graf 24 - Vliv vybraných citrusových flavonoidů na aktivitu superoxid dismutasy (SOD) ve tkáni jater potkanů.**

HSP – hesperidin, HST – hesperetin, NAR – naringin, NRG – naringenin

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD.

## GSH - játra



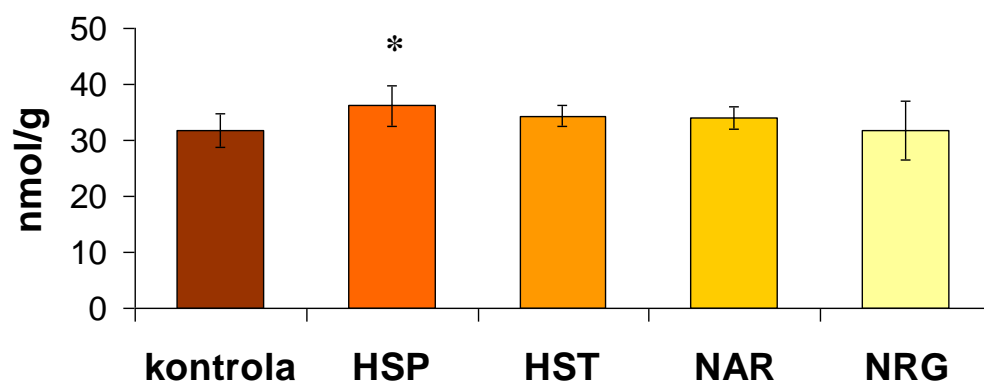
**Graf 25 - Vliv vybraných citrusových flavonoidů na hladinu redukovaného glutathionu (GSH) ve tkáni jater potkanů.**

HSP – hesperidin, HST – hesperetin, NAR – naringin, NRG – naringenin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## LP - játra



**Graf 26 - Vliv vybraných citrusových flavonoidů na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni jater potkanů.**

HSP – hesperidin, HST – hesperetin, NAR – naringin, NRG – naringenin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina



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

Zjištění z tohoto pokusu byla zveřejněna na 16. Mezioborové česko-slovenské toxikologické konferenci TOXCON 2011 (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 na 51. Studentské vědecké konferenci LF UK v Plzni (A. Hodková – Vliv melatoninu na antioxidační systém v akutním pokusu na zdravých a kadmiiem intoxikovaných potkanech (51. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, 19. 5. 2011, Sborník abstrakt).

V této sérii pokusů byl sledován vliv melatoninu na oxidační stres u zdravého a kadmiiem intoxikovaného organismu.

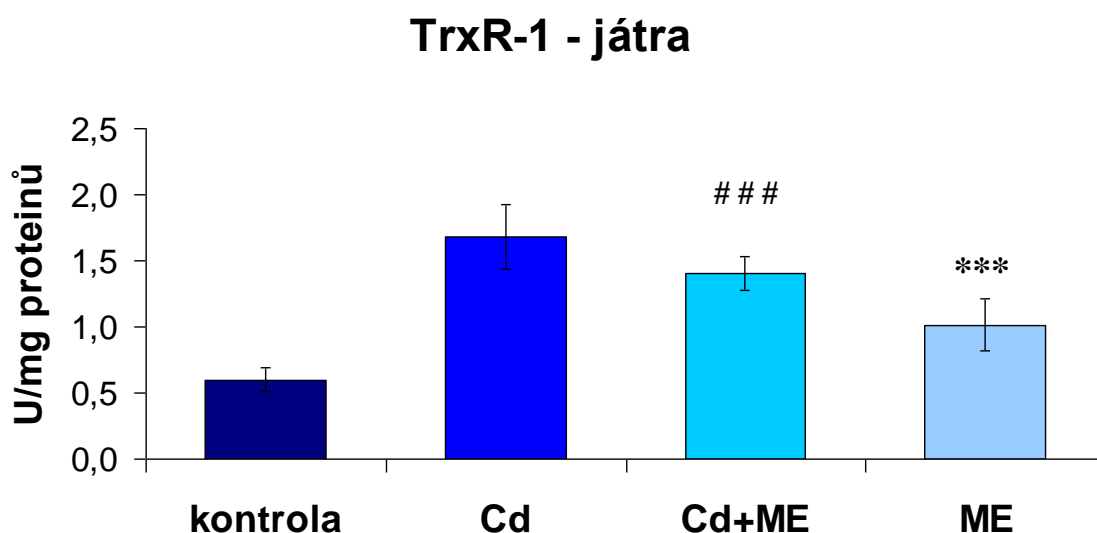
Laboratorní potkani (samci, kmen Wistar, 130 – 140 g) byli rozděleni do 4 skupin po 8 jedincích: I. kontrola; II. Cd; III. Cd+ME; IV. ME. Melatonin (10 mg/kg b.w.) byl rozsuspendován v 0,5 % methylcelulose a podáván sondou perorálně jednou denně po dobu třech dní. Kadmiiem ve formě CdCl<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>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). Kadmiiem (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. (Graf 27, 28, 29, 30, 31, str. 56 - 58)

## 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.



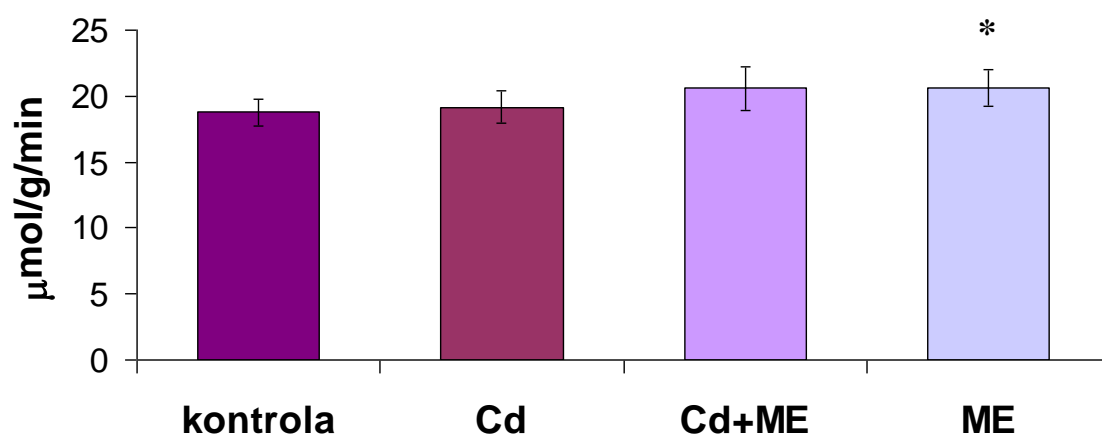
**Graf 27 - Vliv melatoninu (ME) na aktivitu thioredoxin reductasy (TrxR-1) ve tkáni jater zdravých a kadmíem (Cd) intoxikovaných potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD.

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

###  $p < 0,001$  III. skupina vs. IV skupina

### GPx-1 - játra

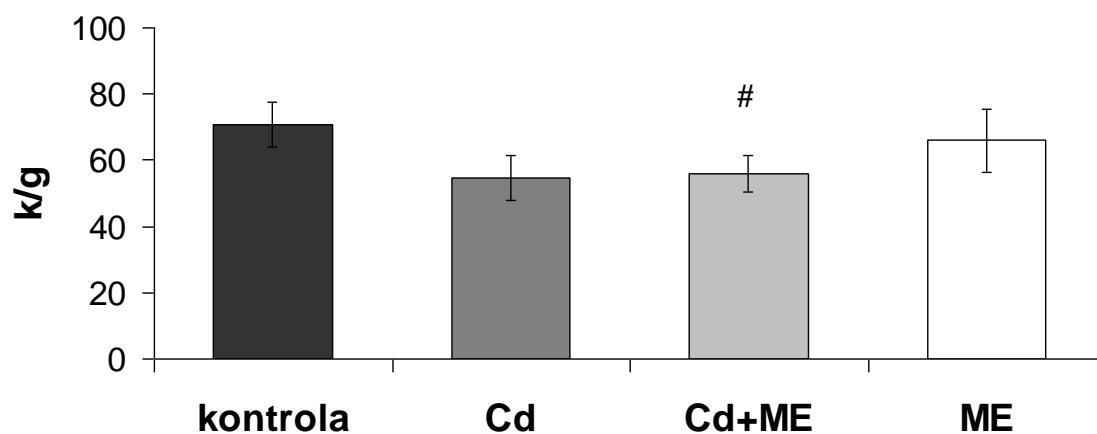


**Graf 28 - Vliv melatoninu (ME) na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni jater zdravých a kadmíem (Cd) intoxikovaných potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

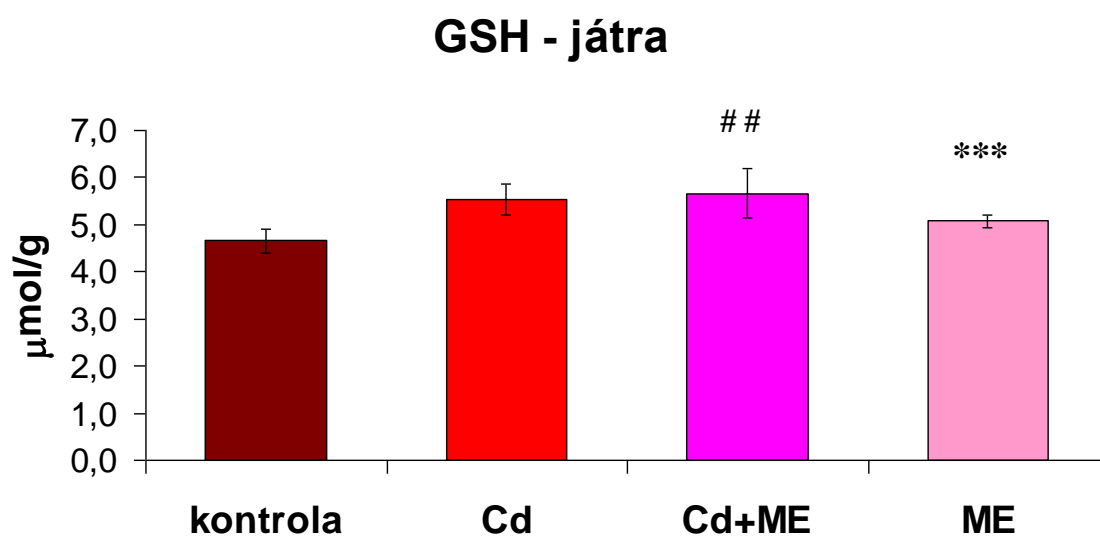
### CAT - játra



**Graf 29 - Vliv melatoninu (ME) na aktivitu katalasy (CAT) ve tkáni jater zdravých a kadmíem (Cd) intoxikovaných potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

#  $p < 0,05$  III. skupina vs. IV skupina

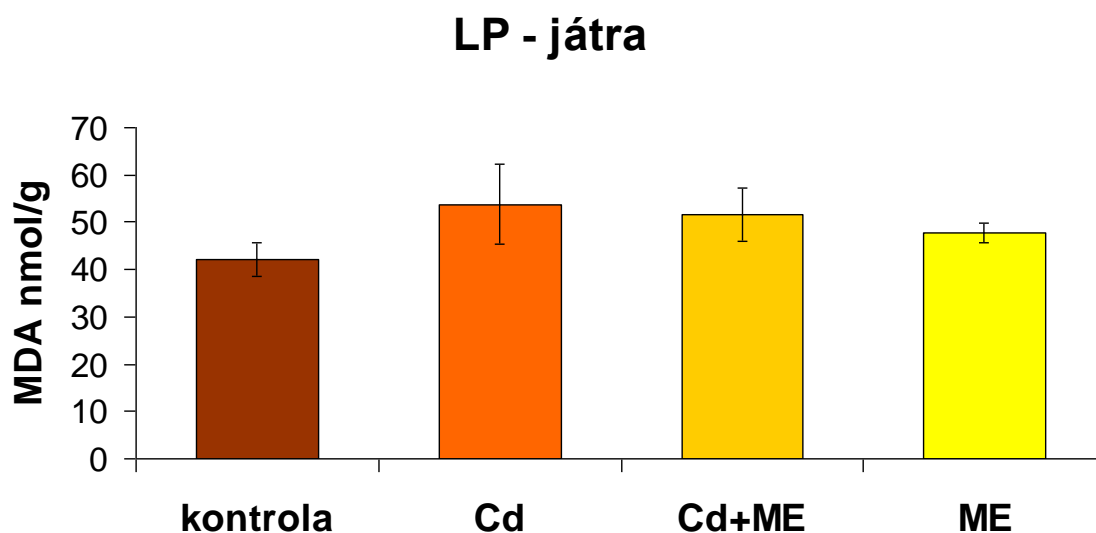


**Graf 30 - Vliv melatoninu (ME) na hladinu redukovaného glutathionu (GSH) ve tkáni jater zdravých a kadmíem (Cd) intoxikovaných potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

##  $p < 0,01$  III. skupina vs. IV skupina



**Graf 31 - Vliv melatoninu (ME) na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni jater zdravých a kadmíem (Cd) intoxikovaných potkanů.**

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

Zjištění z tohoto pokusu byla zveřejněna v časopise Hemoglobin (Hodková A, Černá P, Kotyzová D, Eybl V. 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). Část výsledků z tohoto pokusu byla zveřejněna na konferenci 18. ICOC 2008 (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, Atény, Řecko, 13. - 16. 12. 2008, Sborník abstrakt).

V této sérii pokusů byl sledován vliv železa na oxidační stres a jeho ovlivnění premedikací vybranými látkami (deferipron, naringin, naringenin, myricetin a quercetin).

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 (FeIII) 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 2. 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. (Graf 32, 33, 34, 35, str. 62 – 63)

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

		LP	GSH	GPx-1	TrxR-1
		[nmol MDA/g]	[μmol/g]	[μmol/g/min]	[U/mg proteinů]
Skupina	N				
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 3. 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. (Graf 36, 37, 38, 39, str. 64 - 65)

**Tabulka 3** - Vliv vybraných látek na hladinu LP a GSH a na aktivitu GPx-1 a TrxR-1 v játrech potkanů

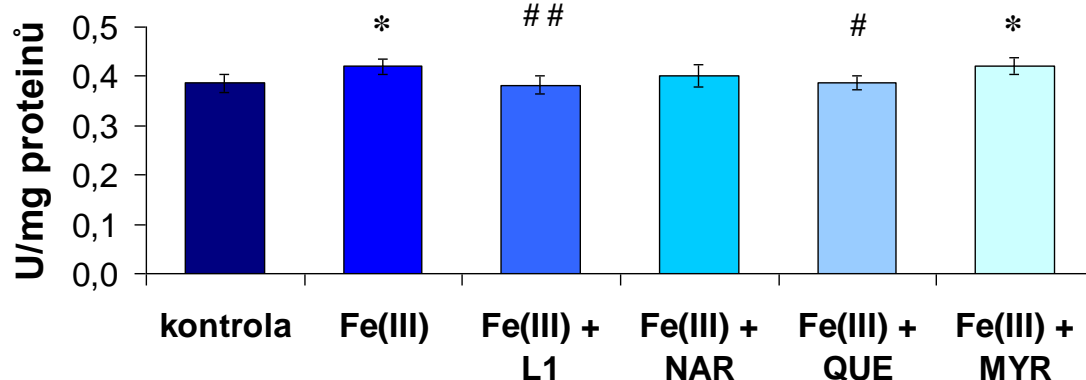
Skupina	N	LP	GSH	GPx-1	TrxR-1
		[nmol MDA/g]	[ $\mu$ mol/g]	[ $\mu$ mol/g/min]	[U/mg proteinů]
kontrola	6	40.33 $\pm$ 5.31	3.17 $\pm$ 0.26	20.86 $\pm$ 0.62	0.66 $\pm$ 0.02
deferipron	6	36.43 $\pm$ 5.13	3.49 $\pm$ 0.32	16.79 $\pm$ 0.38***	0.76 $\pm$ 0.01***
naringin	6	40.20 $\pm$ 2.46	3.48 $\pm$ 0.28	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.

## TrxR-1 - játra



**Graf 32 - Vliv železitých iontů (FeIII) a vybraných látek na aktivitu thioredoxin reduktasy (TrxR-1) ve tkáni jater potkanů.**

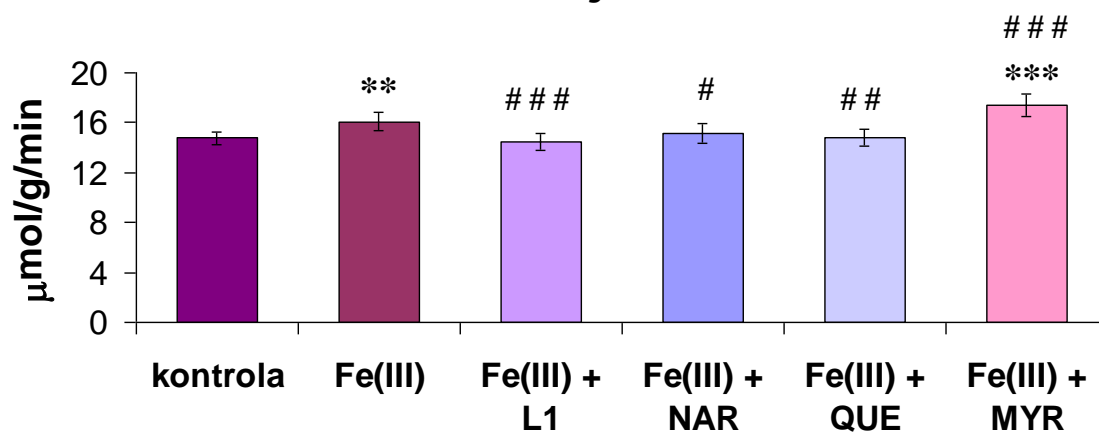
L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

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

## GPx-1 - játra



**Graf 33 - Vliv železitých iontů (FeIII) a vybraných látek na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni jater potkanů.**

L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

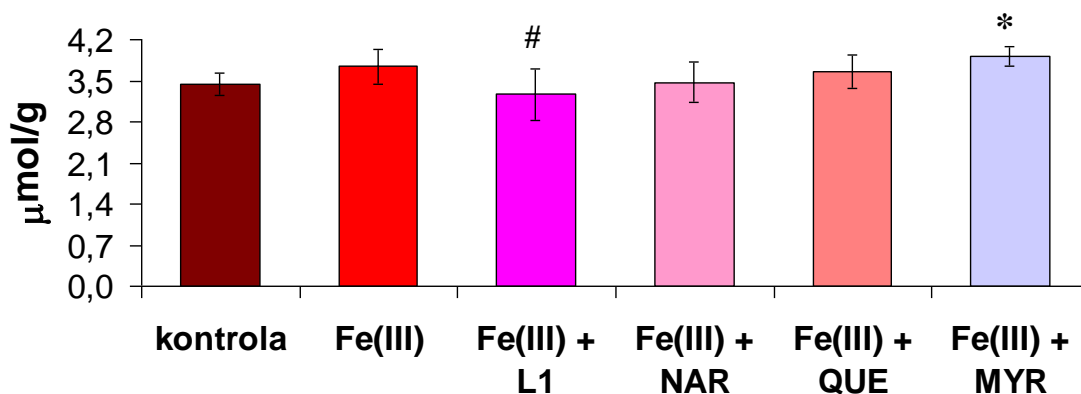
Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

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



## GSH - játra



**Graf 34 – Vliv železitých iontů (FeIII) a vybraných látek na hladinu redukováného glutathionu (GSH) ve tkáni jater potkanů.**

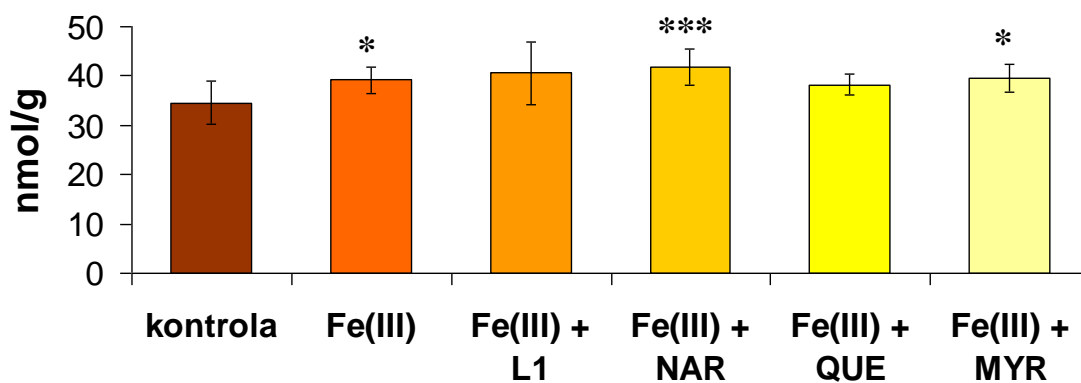
L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

#  $p < 0,05$  vs. Fe(III) skupina

## LP - játra



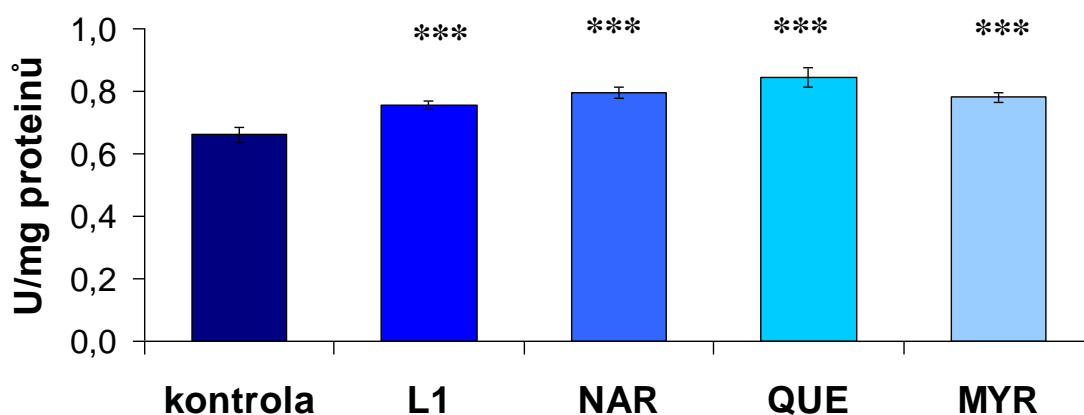
**Graf 35 - Vliv železitých iontů (FeIII) a vybraných látek na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni jater potkanů.**

L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## TrxR-1 - játra



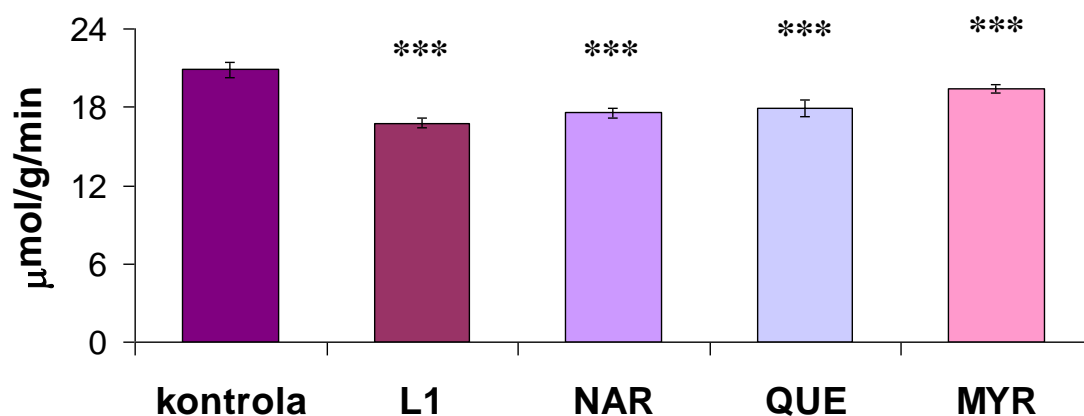
**Graf 36 - Vliv vybraných látek na aktivitu thioredoxin reduktasy (TrxR-1) ve tkáni jater potkanů.**

L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## GPx-1 - játra



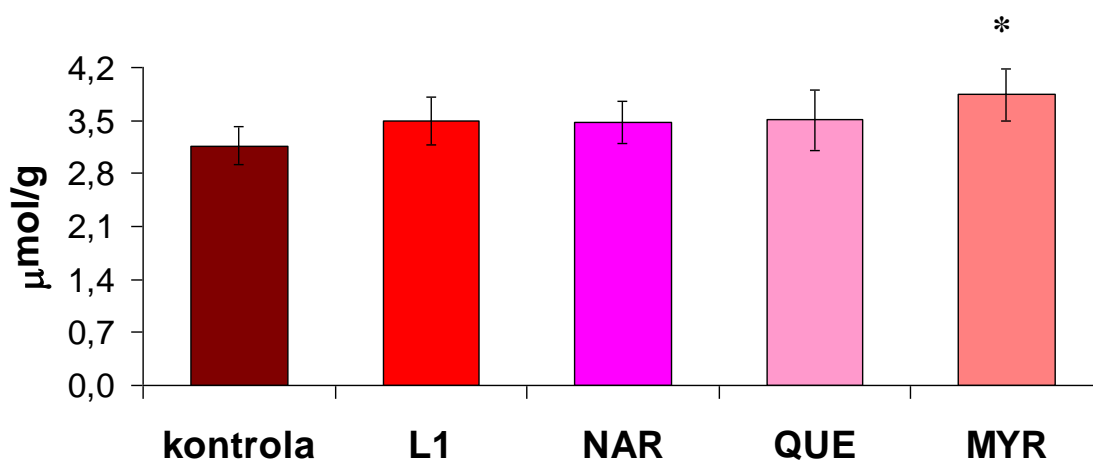
**Graf 37 - Vliv vybraných látek na aktivitu glutathion peroxidasy (GPx-1) ve tkáni jater potkanů.**

L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

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

## GSH - játra



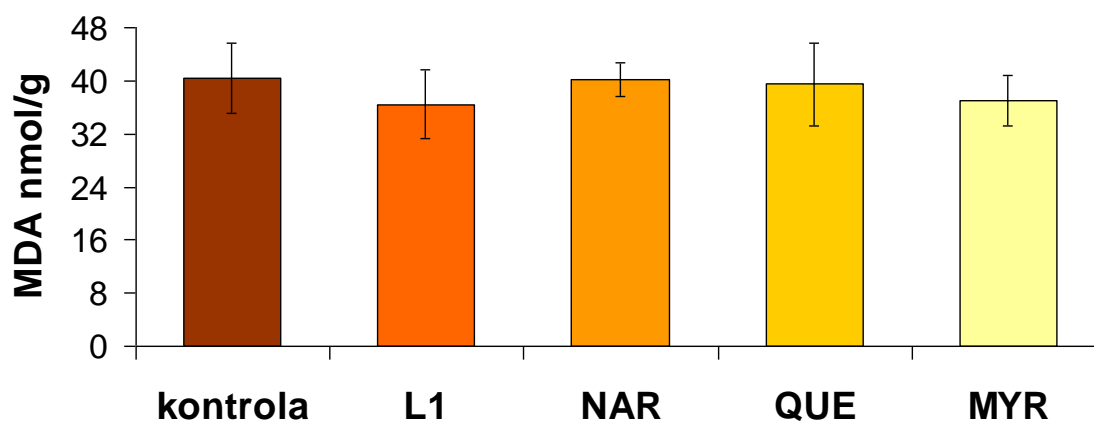
**Graf 38 - Vliv vybraných látek na hladinu redukováného glutathionu (GSH) ve tkáni jater potkanů.**

L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní skupina

## LP - játra



**Graf 39 - Vliv vybraných látek na hladinu peroxidace lipidů (LP) ve tkáni jater potkanů.**

L1 – deferipron, NAR – naringin, QUE – quercetin, MYR – myricetin

Data jsou uvedena jako průměr ± SD.

## 6 Diskuse

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

Porovnáme-li jednotlivé výsledky získané z analýzy jaterní tkáně potkana mezi sebou (Tabulka 4, str. 67), vyjde nám jako nejlepší antioxidant **oleuropein a hydroxytyrosol**, tedy látky obsažené v olivovém oleji. Antioxidační 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 středozevní 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).

**Tabulka 4** - 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 reductasa (TrxR-1)		Glutathion peroxidasa (GPx-1)		Redukovaný glutathion (GSH)		Peroxidace lipidů (LP)		Glutathion reductasa (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					

Na ledvinovou tkáň potkana působily námi vybrané látky jinak než na tkáň jaterní (Tabulka 4, str. 67). 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.

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 léčivou 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, 1996). „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 světlu 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“ (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 prvé 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 oxidační 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 2 a 3 str. 60 a 61.

Výsledky experimentů ukazují zvýšenou aktivitu obou selenoenzymů *in vivo* po aplikaci **železitých iontů** (Tabulka 2, str. 60). 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 3, str. 61). 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 reduktázy (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 reduktase se ukázal jako nový cíl pro vývoj léčiv proti rakovině. Thioredoxin reduktasa 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 inhibiční thioredoxin reduktasy 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 (IC<sub>50</sub> 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 reductasy. 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 antioxidantnímu 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) signifikantně ovlivnily oxidačně redukční rovnováhu v organismu laboratorních potkanů. Aktivita thioredoxin reduktasy 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 reduktasy 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 signifikantně 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.

Arcscott 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 N Y Acad Sci*. 2004; 1030: 348-54.

Brigelius-Flohé R. Selenium compounds and selenoproteins in cancer. *Chem Biodivers*. 2008; 5 (3): 389-95.

Brzóška 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.

Cumaoğlu 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, Doroshow 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.

Chwēłatiuk 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 U S A.* 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/detoxificant 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.

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

## 9. Publikace autora

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)