

Vědecký výbor výživy zvířat

**POVAHA A MECHANISMUS ÚČINKU
ANTIOXIDANTŮ, VÝZNAM VE
VÝŽIVĚ ZVÍŘAT A LIDÍ**

Prof. Ing. Milan Marounek, DrSc.

Praha, prosinec 2006



Výzkumný ústav živočišné výroby
Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,
PSČ: 104 01, www.vuzv.cz

Anotace studie o antioxidantech

Antioxidanty jsou látky, které chrání před škodlivými účinky reaktivních forem kyslíku. Jsou přítomny v rozdílném množství v krmivech a to jak v přirozené podobě, tak i jako přídavky do krmných směsí. Ve výživě hospodářských zvířat mají dvojí význam. Jednak chrání složky krmiva náchylné k oxidaci, v případě selenu a vitamínu E však současně obohacují živočišné produkty o tyto cenné látky. Mohou také zvýšit oxidační stabilitu živočišných produktů. Význam antioxidantů se v posledních letech zvýšil v souvislosti s hlubším poznáváním jejich fyziologických funkcí, v živočišné výrobě pak s širším používáním olejnin.

Obsah

ANOTACE STUDIE O ANTIOXIDANTECH	0
1. ÚVOD	3
2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	3
3. MOLEKULÁRNÍ PODSTATA TOXICITY KYSLÍKU	5
4. CÍLENÁ PRODUKCE REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU	6
5. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A ZDRAVÍ	7
6. ANTIOXIDANTY	9
6.1. SUPEROXID-DISMUTASA	11
6.2. GLUTATHION PEROXIDASA	11
6.3. DALŠÍ OXIDASY A PEROXIDASY	12
6.4. KATALASA	13
6.5. VITAMIN E	13
6.6. VITAMIN C	14
6.7. KAROTENY	15
6.8. FLAVONOIDY	16
6.9. JINÉ ANTIOXIDANTY ALIMENTÁRNÍHO PŮVODU	17
6.10. GLUTATHION	18
6.11. DALŠÍ NÍZKOMOLEKULÁRNÍ ANTIOXIDANTY	19
6.12. JE ANTIOXIDANT TAKÉ CLA?	19
7. ANTIOXIDANTY VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT	19
7.1. PODÁVÁNÍ VITAMINU E	19
7.2. PODÁVÁNÍ SELENU	21
8. SOUVISEJÍCÍ POKUSY USKUTEČNĚNÉ VE VÚŽV	23
8.1. OBSAH SELENU V TKÁNÍCH A JEJICH ANTIOXIDAČNÍ STATUS U TELAT KRMENÝCH DIETOU S DOPLŇKEM SELENOVÝCH KVASNIC	23
8.2. VLIV PŘÍDAVKU SELENU A VITAMINU E DO KRMNÉ DÁVKY TELAT NA KVALITU MASA	26
8.3. OBSAH SELENU V TKÁNÍCH, AKTIVITA GLUTATHION PEROXIDASY A OXIDAČNÍ STABILITA MASA KRÁLÍKŮ KRMENÝCH DIETOU S DOPLŇKEM SELENOVÝCH KVASNIC	29
8.4. OXIDAČNÍ STABILITA MASA KRÁLÍKŮ KRMENÝCH DIETOU S DOPLŇKEM SÍRANU MĚDNATÉHO	31
8.5. DISKUSE VÝSLEDKŮ POKUSŮ S ANTIOXIDANTY	32
9. ZÁVĚREČNÉ POZNÁMKY	32
10. LITERATURA	33

1. Úvod

Reaktivita kyslíku, vznik volných radikálů a potřeba antioxidantů představují daň za život v aerobiose. Reaktivita kyslíku je universální jev, se kterým se setkávají všechny organismy v biosféře. Nebylo tomu tak vždy, naopak, život na Zemi se musel po větší část svého trvání bez kyslíku obejít. V době, kdy život vznikal, atmosféru pravděpodobně tvořila směs dusíku, oxidu uhličitého, argonu a vodních par. Podle současných představ se první kyslík uvolňoval z vody rozkládané účinkem silného ultrafialového záření. Z kyslíku vznikal ozón, který pozvolna vytvářel kolem Země ozónový pás a snižoval intenzitu záření. Vznik ozónového pásu umožnil přechod z vody na souš a snížil tvorbu organických látek v dávných mořích. To vyvolalo evoluční tlak a primitivní organismy byly donuceny hospodařit se zdroji energie úsporněji. V té době se pravděpodobně objevily první fotosyntetizující bakterie, pak zelené řasy a později i vyšší rostliny. Ačkoliv se fotosyntetizující organismy objevily dosti záhy, na složení atmosféry zprvu neměly větší vliv, protože uvolněný kyslík se spotřebovával oxidací anorganických sloučenin v oceánech, např. reakcí s železnatými ionty.

K prudkému vzestupu koncentrace kyslíku v ovzduší došlo pravděpodobně někdy před více než miliardou let, zásluhou zelených rostlin. Vznikly organismy tolerující kyslík a posléze i organismy dýchající kyslík. Vznik kyslíku měl zásadní význam pro další vývoj života do těch forem, v jakých jej známe dnes. Umožnil získávat energii v daleko větším rozsahu, než se to daří anaerobním organismům, tj. organismům žijícím bez kyslíku. Např., glukosa při anaerobní fermentaci za vzniku kyseliny mléčné poskytne energii uloženou do 2 ATP, při oxidaci na $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ však získá energii představující 38 ATP. Zato se však všechny organismy musí vyrovnat s existencí reaktivních forem kyslíku, které jsou pro buněčné struktury nebezpečné.

2. Reaktivní formy kyslíku

Kyslík je silným oxidantem a reaguje s velkým množstvím organických i anorganických látek. Za nejdůležitější reaktivní formu kyslíku je považován **superoxidový radikál** $\text{O}_2^{\cdot -}$, z něhož vznikají další reaktivní formy kyslíku (Fee, 1982). Asi 1 – 3% O_2 , který aerobní organismy využívají, se na tento radikál přeměňuje. Má povahu anionu a vzniká tam, kde je ve vodném prostředí přítomen kyslík, účinkem ionizujícího záření nebo ultrazvuku, také při některých enzymových reakcích a při autooxidaci organických látek.

Molekula kyslíku (O_2) má charakter diradikálu daný tím, že má dva nepárové valenční elektrony. Pauling v r. 1931 navrhl strukturu molekuly s jednou jednoduchou vazbou a dvěma

3-elektronovými vazbami, z nichž každá obsahuje nepárový elektron. Základní stav kyslíku, ve kterém oba nepárové elektrony mají paralelní spin, se nazývá tripletový. (Spin je vlastnost elementárních částic, která nemá obdobu v klasické fyzice, něco jako vnitřní moment hybnosti). Přijetím malého množství energie vzniká **singletový kyslík**, v němž oba nepárové elektrony mají spin antiparalelní (Morris, 1975). Singletový kyslík je mnohem reaktivnější než kyslík v základním stavu a může vznikat při různých chemických a biochemických reakcích (Diplock a kol., 1998). Má poločas života 10^{-6} s. Nejčastěji vzniká ze superoxidového iontu touto reakcí:

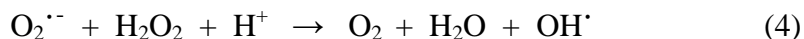


Kromě toho vzniká i při některých reakcích fotochemických, kdy látka absorbující světlo převede tripletový kyslík na reaktivní kyslík singletový. Ten vzniká i při fyziologických biochemických reakcích. Např. v malém množství vzniká v dýchacím řetězci.

Nejreaktivnější formou O_2 je **hydroxylový radikál** OH^{\cdot} (Halliwell, 1979). Je schopen poškodit všechny biologické makromolekuly, naštěstí poločas jeho života je pouze 10^{-9} s. Vzniká buď fyzikálně ionizujícím zářením, nebo chemicky Fentonovou reakcí (Powell, 2000) peroxidu vodíku s ionty Fe^{2+} či Cu^+ :



Také vzniká reakcí superoxidového radikálu s peroxidem vodíku:



Hydroxylový radikál OH^{\cdot} zde vzniká spolu se singletovým kyslíkem. Dále vzniká reakcí peroxidu vodíku s železnatými ionty, při tepelném, radiačním a světelném rozkladu vody a při některých reakcích spojených s přenosem elektronů. Hydroxylové radikály jsou hlavní příčinou poškození biologických polymerů v živých organismech účinkem ionizujícího záření. Pro svou vysokou reaktivitu existují ve vodných roztocích jen v nízkých koncentracích.

Méně reaktivní formou kyslíku je **peroxid vodíku** (H_2O_2). Není volným radikálem (Morris, 1975), to však neznamená, že není škodlivý. Jeho hlavní význam spočívá v účasti na výše uvedených reakcích. Má delší poločas trvání než volné radikály.

Peroxylový radikál ROO[·] vzniká oxidací nenasycených mastných kyselin a rozpadem reakčního produktu (Halliwell, 1979). Molekulárním předchůdcem peroxylového radikálu je hydroperoxid, který vzniká reakcí kyslíku s dvojnou vazbou mastné kyseliny. Peroxidace lipidů je řetězová reakce poskytující stálý přísun volných radikálů, které působí další peroxidaci. Schopností indukovat peroxidaci lipidů se vysvětluje toxicita halogenovaných organických látek, např. CCl₄. V organismu z něj vzniká trichlormethylový radikál CCl₃[·] a reakcí s kyslíkem sloučenina CCl₃O₂[·], která peroxidaci lipidů iniciuje. Uvedený příklad také ilustruje existenci radikálů, které kyslík neobsahují. Jiné významné radikály budou zmíněny v dalším textu.

3. Molekulární podstata toxicity kyslíku

Účinek kyslíku na buňku je velmi široký, zahrnuje řadu faktorů a neexistuje jednotná teorie, která by jej vysvětlovala. Nejstarší vysvětlení přičítalo toxické účinky kyslíku **ztrátě aktivity enzymů** v důsledku oxidace jejich thiolových skupin. Může také dojít k poškození proteinů oxidační deaminací aminoskupin. Tento názor lze doložit i řadou konkrétních příkladů. Např. nitrogenasa bakterie *Clostridium pasteurianum* je nevratně inhibována při byť i jen krátkém vystavení O₂. K aktivitě tohoto enzymu je nutný vysoce redukovaný stav jeho kofaktorů; při jejich oxidačním poškození se ztrácí. Podobně se vysvětluje extrémní citlivost methanobakterií k přítomnosti kyslíku. Labilním enzymem při tvorbě methanu je např. methyl reduktasa (Morris, 1975). Poškození aktivity enzymů oxidací thiolových skupin se však neomezuje na enzymy anaerobních mikroorganismů. Kyslíkem je např. poškozován glykolytický enzym glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenasa. Poškození sítnice vystavené zvýšené koncentraci O₂ lze zčásti vysvětlit snížením aktivity tohoto enzymu, neboť sítnice na glykolýze coby zdroji energie závisí.

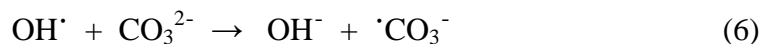
Jiný názor přičítá toxicitu O₂ **tvorbě peroxidu vodíku** (Halliwell, 1979). Buněčné oxidasy, např. oxidasy aminokyselin a kyseliny močové přenáší elektrony na O₂, čímž peroxid vodíku vzniká:



Ve vyšších koncentracích H₂O₂ ničí většinu buněk. V nižších koncentracích inhibuje fixaci CO₂ v chloroplastech. Soudí se však, že H₂O₂ není primární příčinou toxicity O₂. Sám o sobě není příliš reaktivní, v přítomnosti iontů kovů (např. Fe a Cu) se však rozkládá za vzniku mnohem reaktivnějšího hydroxylového radikálu.

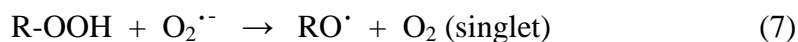
Další názor přičítá toxicitu O₂ **peroxidaci lipidů**. Lipidy buněčných membrán obsahují velké množství polynenasycených mastných kyselin, které jsou podstatné pro udržení fluidity vnitřku membrán a zajištění transportních funkcí. Polynenasycené mastné kyseliny jsou náchylné k oxidaci (ta se zvyšuje úměrně třetí mocnině počtu dvojných vazeb). Peroxidace fosfolipidů s polynenasycenými mastnými kyselinami je pomalá jsou-li v čisté podobě, rychlost peroxidace se však prudce zvyšuje za přítomnosti iontů kovů nebo sloučenin obsahujících hem. Po svém rozběhu je peroxidace autokatalytická, což znamená, že probíhá snadno. Peroxidy lipidů jsou účinné inhibitory mnoha enzymů. Rozpadají se za vzniku aldehydů, např. malondialdehydu. Aldehydy snadno reagují s aminoskupinami proteinů a poškozují jejich funkce. Při rozpadu peroxidů lipidů může vzniknout singletový kyslík.

Toxicitu O₂ lze velmi věrohodně vysvětlit **poškozením membrán a biologicky významných makromolekul**. Biologicky důležité makromolekuly, tj. proteiny a nukleové kyseliny mohou být poškozeny radikálovými sloučeninami i singletovým kyslíkem (Halliwell, 1979). Nejnebezpečnější reaktivní formou O₂ je hydroxylový radikál. Hydroxyluje purinové a pyrimidinové báze v nukleových kyselinách, tím poškozují zápis genetické informace a způsobuje mutace. Podobně atakuje i molekuly proteinů. Reaguje s uhličitanovými ionty za vzniku karbonátových radikálů:



Karbonátové radikály jsou sice méně reaktivní, jejich poločas rozpadu je ale zato delší.

Hydroxylový radikál a rovněž singletový O₂ mohou iniciovat peroxidaci lipidů. Superoxidový radikál naproti tomu dvojně vazby v lipidech nenapadá. Je však schopen reagovat s peroxidy lipidů za vzniku alkoxylových radikálů (RO[·]):



Alkoxylový radikál může vstoupit do řetězové reakce peroxidace lipidů. Superoxidový radikál může také způsobit nukleofilní atak esterových vazeb v membránových fosfolipidech. Výsledkem je jejich deacylace a ztráta funkce.

4. Cílená produkce reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy O₂ cíleně vznikají ve fagocytujících leukocytech při tzv. respiračním vzplanutí, jehož účelem je usmrtit pohlcenou bakterii. Po pohlcení bakterie dojde k prudkému zvýšení spotřeby O₂ a vzniká velké množství jeho reaktivních derivátů jako O₂^{·-}, H₂O₂, OH[·] a

OCl^- (Murray a kol., 1998). Řetězec přenášející elektrony, který odpovídá za respirační vzplanutí, se skládá z NADPH-oxidasy a cytochromu typu b. Systém katalyzuje 1-elektronovou redukci O_2 na superoxidový radikál. NADPH je generován v pentosafosfátovém cyklu, jehož aktivita je při fagocytose zvýšena. Superoxidový radikál je poté odstraňován superoxid-dismutasou. Vznikající H_2O_2 (viz reakce č. 1) je odstraňován katalasou či glutathion peroxidasou, nebo vstupuje do reakce katalyzované myeloperoxidasou:



Kyselina chlorná je silný oxidant s mikrobicidními účinky. Podobně dokáže imunitní systém ničit i nádorové buňky.

Radikálovou povahu má oxid dusnatý NO^\bullet . V organismu vzniká enzymovou reakcí z argininu:



Vzniká také z nitrosloúčenin, např. z nitroglycerinu, známého léku při angině pectoris. Má řadu fyziologických funkcí. Účastní se výše popsaného respiračního vzplanutí, rozšiřuje cévy (účinek vasodilatační), podílí se na nervovém přenosu a mezibuněčné komunikaci.

Reaktivní formy O_2 se také podílí na tvorbě prostaglandinů, což jsou „hormon like“ látky syntetizované ve většině buněk. V rostlinách vznikají oxidací fenolových látek radikály, které jsou prekursory ligninu. Kondenzací těchto radikálů, která není enzymově řízena, vzniká lignin. Příkladů cílené produkce reaktivních forem O_2 je víc.

5. Reaktivní formy kyslíku a zdraví

V organismu reaktivní formy kyslíku vznikají zejména při redukci O_2 v dýchacím řetězci, umístěném ve vnitřní membráně mitochondrií (Kalous a Dražota, 1996). Vznikají však i na jiných místech, neboť Fentonovu reakci může katalyzovat i hemové železo (Sadrzadeh a kol., 1984). Při zvýšené spotřebě kyslíku, např. při větší tělesné zátěži, vznikají ve větší míře. V takové situaci by organismus měl mít antioxidantů k dispozici více. Reaktivním formám O_2 je přičítán podíl na vzniku řady onemocnění. Soudí se, že volné radikály hrají roli při vzniku atherosklerosy, poruch imunity, chorob očních, neurodegenerativních a karcinomů. U některých onemocnění je souvislost zjevná, u některých ve stádiu výzkumu. Oxidace cholesterolu je např. zdrojem oxidovaných lipoproteinů lidského

séra. Tyto cizorodé látky jsou odstraňovány fagocytujícími makrofágy. Při oxidačním stresu je však makrofág natolik zatížen oxidovanými LDL, že není schopen vrátit se do cirkulace, zůstává *in situ* a vytváří pěnovou buňku – základ atherosklerotických změn, což vede ke zmenšení průtočného profilu v artériích usazeninami lipidové povahy. Oxidované produkty cholesterolu jsou jednak původu endogenního, jednak důsledkem tepelných úprav potravy (Eder a kol., 2005). Vztah mezi účinkem reaktivních forem O_2 , vznikem různých onemocnění a působením antioxidantů je předmětem velkého zájmu. Kromě pokusů na zvířatech jsou k dispozici výsledky rozsáhlých epidemiologických studií, jejichž závěry jsou velmi cenné, současně je však nutno dbát jisté opatrnosti, neboť zjištěný vztah dvou faktorů může být projevem příčiny další, která s předchozími souvisí jen náhodně nebo nepřímo. Epidemiologické studie prokázaly inverzní vztah mezi koncentrací vitamínu C a E v plasmě a rizikem **kardiovaskulárních onemocnění**. Vitamin E účinně brání oxidaci lipidů. Naproti tomu vitamin C, který působí ve vodné fázi je účinný méně, s vitaminem E se však vhodně doplňuje. Krajčovičová–Kudláčková a kol. (2006) zpravují o negativní korelaci mezi koncentrací vitamínu C v plasmě a produkty oxidačního poškození DNA, lipidů a proteinů. Toto oxidační poškození bylo významně vyšší u osob s koncentrací vitamínu C v plasmě menší než 50 $\mu\text{mol/l}$. Podle zjištění autorů ochranné účinky vitamínu C se projevují při alimentárním příjmu větším než 110 mg/den. Reaktivní formy kyslíku se rovněž podílí na vzniku některých druhů **rakoviny**. Poškozují nukleové kyseliny a také enzymy zapojené do detoxikací – tím brání zneškodnění potenciálních kancerogenů. Nejběžnějším typem rakoviny je rakovina plic. Asi 90 % onemocnění rakovinou plic lze připsat kouření. Riziko rakoviny plic se zvyšuje při stravě bohaté tukem a chudé na zeleninu a ovoce. Naopak každodenní příjem zeleniny s vysokým obsahem antioxidantů riziko rakoviny plic snižuje (Virtamo, 1999). Plíce jsou orgánem, v němž je styk tkání s kyslíkem zvláště intenzivní. Vysvětlením ochranného účinku zeleniny se proto zdá být přítomnost antioxidantů, které v zelenině jsou ve značném množství. Reaktivní formy kyslíku mohou mít vinu na **zhoršení zraku** tím, že poškozují proteiny v čočce oka. Tyto proteiny se obměňují velmi pomalu, čímž se poškození snadno kumuluje. Vznik reaktivních forem kyslíku je v čočce oka usnadněn účinkem světla. Kojencům v inkubátoru se musí krýt oči, protože v podmínkách nadbytku kyslíku (kvůli nedostatečné funkci plic) a světla by mohlo dojít k oslepnutí. U **nervově degenerativních onemocnění** spočívá škodlivý vliv reaktivních forem O_2 v poškození membrán nervových buněk peroxidací lipidů v buněčných membránách. Membrány pak nejsou schopny udržet iontové gradienty a buňka zaniká. Význam vitamínů E a C pro nervový systém je prokázán. Pokles v jejich žádoucí koncentraci vede k poškození struktury a funkce nervových buněk.

Antioxidanty zřejmě zpomalují nástup nervově degenerativních chorob, souvisejících se stárnutím. Naše znalost celého komplexu problémů, které tyto choroby představují, je však dosud omezená. V literatuře se také uvádí, že peroxidace lipidů spermatozoí je jedna z důležitých příčin **poruch plodnosti** u mužů. Obsah antioxidantů ve spermatu má na plodnost přímý vliv. Rovněž se uvádí souvislost mezi hyperglykemií danou **necitlivostí tkání na insulin** (diabetes typu II) a zvýšenou koncentrací volných radikálů v plasmě (Ceriello, 2000). S tím souvisí zkušenost, že zvýšený příjem antioxidantů účinnost insulinu zlepšuje. K oxidačnímu stresu je obzvlášť citlivý **imunitní systém**. Je to jednak dáno tím, že závisí na mezibuněčné komunikaci dané membránovými receptory a je tudíž vnímavý k poškození membrán peroxidací lipidů. Současně ale též tím, že fagocytující leukocyty reaktivní radikály cíleně generují a jejich membrány mohou jimi být poškozeny, zejména za nedostatku antioxidantů. Je také znám negativní vliv kouření na výkonnost imunitního systému, daný tím, že cigaretový kouř volné radikály ve velkém množství obsahuje (Hughes, 1999). Příznivý vliv antioxidantů, zejména vitaminů C a E na imunitní funkce je všeobecně znám.

Škodlivé účinky reaktivních forem kyslíku bere v úvahu i jedna z teorií stárnutí. Podle ní souvisí s hromaděním se poškozením DNA, které reparační enzymy nestačí opravit. K příčinám stárnutí se řadí i poškození dalších buněčných struktur volnými radikály. S postupem věku se zvyšuje, neboť klesá schopnost syntézy enzymů, které před tímto poškozením chrání.

6. Antioxidanty

Chemické sloučeniny, které se účastní reakcí při nichž vznikají toxické formy kyslíku se nazývají **prooxidanty**. Naopak, sloučeniny, které brání vzniku těchto forem, nebo je likvidují se nazývají **antioxidanty**. Mezi prooxidanty a antioxidanty existuje v organismu rovnováha. Je-li porušena, např. nedostatkem antioxidantů, nebo podáním některých léků, dochází k tzv. oxidačnímu stresu. Má-li dlouhé trvání, může mít závažné důsledky (Blache a kol., 1999). Jako indikátory oxidačního stresu se stanovují produkty lipoperoxidace, peroxidace proteinů, oxidačně poškozené DNA a úbytek antioxidantů v plasmě.

Antioxidanty rozdělujeme podle prostředí, v němž působí na hydrofilní, lipofilní a amfofilní. Podle způsobu účinku na antioxidanty neenzymové povahy (vitamin E, C, karoteny, flavonoidy, kyselina močová, kyselina fytová, glutathion, kyselina ferulová) a enzymy (superoxid-dismutasa, glutathion peroxidasa, katalasa). Mezi neenzymové antioxidanty se počítají i některé prvky, které však souvisí s funkcí enzymů (selen, zinek, měď). Kromě toho existuje řada antioxidantů vyráběných průmyslově, které se používají jako

potravinářská aditiva. Některé z nich se odvozují z látek přírodních. Je to semisynteticky připravená kyselina askorbová (E 300, tj. vitamin C), její sodná (E 301) a vápenatá (E 302) sůl, estery mastných kyselin s kyselinou askorbovou (E 304), extrakt s obsahem tokoferolů (E 306, tj. s vitaminem E), α -tokoferol (E 307), γ -tokoferol (E 308), δ -tokoferol (E 309), propylgallát (E 310), oktylgallát (E 311), dodecylgallát (E 312), kyselina erythorbová, což je syntetická kyselina isoaskorbová (E 315), její sodná sůl (E 316), butylhydroxyanisol (E 320) a butylhydroxytoluen (E 321). Běžným antioxidantem jsou rovněž siřičitany (víno, sušené ovoce).

Antioxidanty butylhydroxyanisol (BHA) a butylhydroxytoluen (BHT) jsou určeny také pro všechny druhy a kategorie zvířat. Totéž platí pro antioxidant etoxyquin (E 324). Maximální množství všech antioxidantů je 150 mg v 1 kg kompletní krmné směsi. Antioxidanty se do potravin často přidávají. Vitamin C se přidává do džemů, sirupů, limonád, džusů a pyré. Vitaminem E se fortifikují rostlinné oleje. Záhřev potravin antioxidanty poškozuje. U karotenů navíc dochází k změně konfigurace dvojných vazeb z *trans*- na *cis*-. *Cis*-isomery karotenů jsou špatně vstřebatelné. Oxidační poškození potravin se snižuje granulací, ochranou před světlem, vakuovým balením a atmosférou dusíku. Snižování oxidace labilních látek je jedním z důvodů granulace krmiv. Ztráty antioxidantů při skladování mohou být značné. Díky pokroku v analytice je dostatek údajů o tom, kolik kterých antioxidantů se v potravinách a krmivech nachází. Problém je s karotenoidy a flavonoidy, kterých je mnoho a sledovaly se tudíž jen hlavní z nich.

Obrana proti reaktivním formám kyslíku prošla složitým fylogenetickým vývojem. Jejím prvním způsobem bylo vytvoření fyzických bariér, které bránily přístupu reaktivních forem kyslíku k oxilabilním buněčným strukturám, např. soustředění chlorofylu do organel (Benzie, 2000). U soudobých organismů tíha obrany proti reaktivním formám kyslíku spočívá jednak na enzymech k tomu účelu určených, jednak na antioxidantech z potravy. Ne všechny faktory obrany proti kyslíku musí být v buňce přítomny neboť se mohou zastupovat. Zejména u mikroorganismů jsou v toto směru velké rozdíly. Organismus se také snaží vzniku reaktivních forem O_2 předcházet. Jejich vznik je často katalyzován ionty železa a mědi. Proto jsou koncentrace těchto iontů udržovány na nízké úrovni a železo a měď jsou vázány na bílkoviny: ferritin a transferrin (Fe) a ceruloplasmin (Cu). V dalším textu bude o jednotlivých enzymech a antioxidantech stručně pojednáno.

6.1. *Superoxid-dismutasa*

Ústředním článkem obrany proti reaktivním formám kyslíku je u aerobních a anaerobních organismů enzym superoxid-dismutasa (Hassan a Fridovich, 1979). Katalyzuje rozklad superoxidových iontů (podle rovnice č. 1), a brání tak vzniku mnohem reaktivnějších a nebezpečnějších hydroxylových radikálů (rovnice č. 4). Rozklad probíhá i za nepřítomnosti tohoto enzymu, jeho přítomnost však rychlost reakce zvyšuje o 4 řády. Superoxid-dismutasovou aktivitu mají i komplexy aminokyselin s mědí a dokonce v menší míře i pouhé ionty manganu. V aktivním centru enzymu se nachází atom kovu.

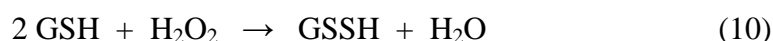
Superoxid-dismutasa se nachází v několika typech (Macek, 1980). Ty, které obsahují Fe nebo Mn jsou necitlivé ke kyanidu. Enzym obsahující Cu a Zn je ke kyanidu citlivý. Mitochondrie živočichů mají dvě odlišné superoxid-dismutasy, s Fe a Mn, necitlivé na kyanid. Mn-superoxid-dismutasa má velmi podobnou sekvenci aminokyselin jako stejný enzym z bakterií, obdobné shody lze nalézt i u mitochondrií rostlin, což potvrzuje teorii o symbiotickém původu mitochondrií. Aktivita superoxid-dismutasy koreluje s intenzitou aerobního metabolismu. Např. fakultativně anaerobní bakterie *Escherichia coli* disponuje dvěma superoxid-dismutasami. První je obsažena i v buňkách rostoucích bez přístupu kyslíku a je umístěna vně cytoplasmatické membrány. V jejím aktivním centru se nachází atom železa. Za přístupu kyslíku se syntetizuje druhá superoxid-dismutasa, která obsahuje atom manganu a působí uvnitř buněk. Tudiž pouze první enzym je konstitutivní, druhý je indukován zvýšenou koncentrací svého substrátu. V posledních letech byly popsány superoxid-dismutasy u celé řady anaerobních bakterií, např. u bacherových, střevních a patogenních bakterií izolovaných ze zánětlivých ložisek. Předpokládá se, že u poslední zmíněné skupiny bakterií představuje superoxid-dismutasa faktor virulence. Umožňuje anaerobní bakterií přežít v tkáni zásobené kyslíkem až do té doby, než se vytvoří anaerobní podmínky vhodné pro její růst. O superoxid-dismutase dnes existují stovky prací. Zájem o ní vyplývá nejen z její role při metabolismu kyslíku, ale také ze souvislosti s radiačním poškozením živočišných tkání, s účinkem kancerogenních látek, s procesy stárnutí, působením herbicidů apod.

6.2. *Glutathion peroxidasa*

Glutathion peroxidasa je hlavní selenoenzym (Behne a Kyriakopoulos, 2001). K selenoenzymům patří ještě několik dalších významných enzymů, vesměs katalyticky aktivních v redoxních reakcích. Jedná se zejména o thioredoxin reduktasy a jodothyronin dejodiny. V aktivním centru všech těchto enzymů je aminokyselina selenocystein. Jeho

skupina – SeH je, na rozdíl od skupiny – SH, za fyziologického pH ionizována a ve srovnání s thiolovou skupinou je mnohem reaktivnější.

Glutathion peroxidasa katalyzuje redukci peroxidu vodíku a organických hydroperoxidů, čímž chrání před jimi způsobeným oxidačním poškozením. Jak název napovídá, glutathion (tripeptid z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu) slouží jako donor elektronů, jsou však případy, kdy jej zastupuje jiná thiolová sloučenina:

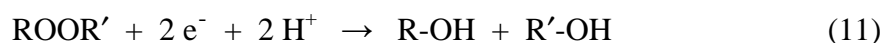


Tč. je známo 5 glutathion peroxidas:

- 1) Cytosolická (klasická) glutathion peroxidasa. Byla prvním identifikovaným selenoproteinem. Je přítomna téměř ve všech tkáních, ale v rozdílné aktivitě. Nejvyšší aktivitu má v játrech a erythrocytech, nejnižší v kosterním svalstvu a mozku. Působí v souhře s vitamínem E, který je „lapačem“ volných radikálů. Při deficitu selenu v dietě je její aktivita nízká, k patologickým projevům nicméně dochází až při současném nedostatku vitamínu E.
- 2) Gastrointestinální glutathion peroxidasa se u člověka nachází jen v trávicím traktu a játrech. V epitelu trávicího traktu má srovnatelnou aktivitu jako cytosolická glutathion peroxidasa. Zdá se, že má význam pro prevenci kolorektálního karcinomu.
- 3) Plasmatická glutathion peroxidasa se od předchozích liší tím, že je glykoproteinem. Hlavním místem její syntézy jsou ledviny. Její specifická aktivita je nízká, zřejmě proto, že je nízká koncentrace glutathionu v krvi. Glutathion v roli donoru elektronů však může být v tomto případě zastoupen thioredoxinem.
- 4) Glutathion peroxidasa redukující hydroperoxydy fosfolipidů a cholesterolu je velmi významná pro ochranu biologických membrán před oxidační destrukcí. Má též funkci regulační při zánětlivé reakci a při programovaném zániku buněk, také při spermatogenezi.
- 5) Glutathion peroxidasa nacházející se pouze ve spermatu. V organismu se objevuje s nástupem puberty a je nezbytná pro maturaci spermií a plodnost.

6.3. Další oxidasy a peroxidasy

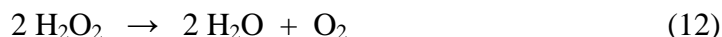
Řada oxidas používá k oxidaci svého substrátu molekulární O_2 , tím jej odstraňuje z prostředí. Peroxidasy rozkládají peroxid vodíku a organické hydroperoxydy:



Liší se substrátovou specifitou a povahou donoru elektronů. Často se nachází v extracelulárních tekutinách. Sliny a mléko obsahují peroxidasy, které využívají H₂O₂ k oxidaci thiokyanátu na sloučeniny s bakteriálním účinkem. Laktoperoxidasa spolu s xanthin oxidasou představují hlavní enzymy mléka (Shah, 2000).

6.4. Katalasa

Katalasa je enzym, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík:



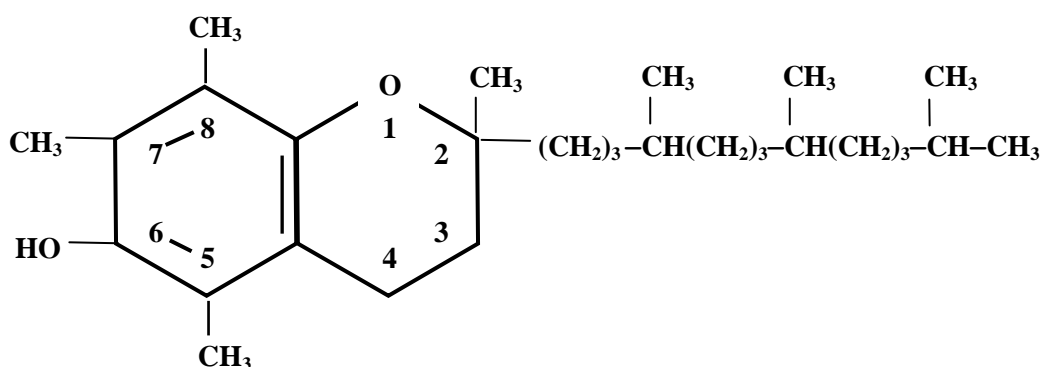
V aktivním centru obsahuje Fe vázané v hemu. Katalasa také peroxidem vodíku oxiduje různé toxiny, např. formaldehyd:



Katalasa pracuje v souhře se superoxid-dismutasou. Likviduje peroxid vodíku, který účinkem superoxid-dismutasy vzniká podle reakce č.1. Na fyziologický význam katalasy ukazuje skutečnost, že patří k enzymům s největší rychlostí přeměny substrátu.

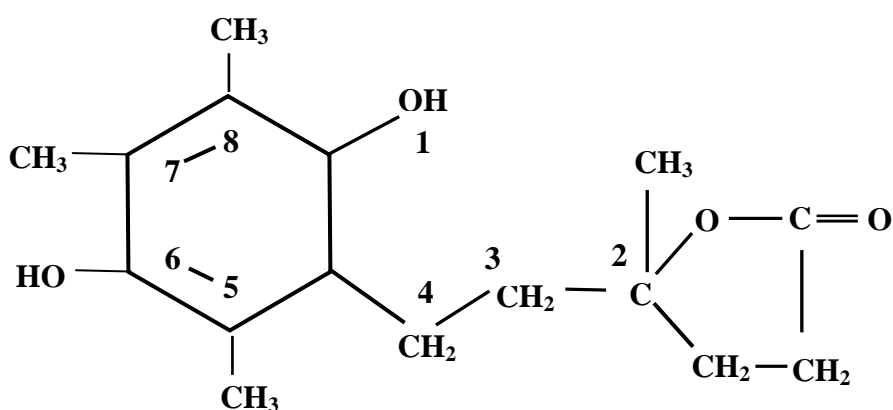
6.5. Vitamin E

Vitamin E je hlavním antioxidantem potravy (Murray a kol., 1998). Z chemického hlediska je směsí tokoferolů označovaných α , β , γ , δ , z nichž α je nejdůležitější. Derivát γ je hlavním tokoferolem sojového oleje, který je v některých zemích hlavním olejem.



<i>Tokoferol</i>	<i>substituenty</i>
Alfa	5,7,8-Trimethyltokol
Beta	5,8-Dimethyltokol
Gama	7,8- Dimethyltokol
Delta	8-Methyltokol

Vitamin E je lipofilní sloučenina a působí proto v membránách a lipoproteinech. Fosfolipidy mitochondrií endoplasmatického retikula a plasmatických membrán mají k vitaminu E afinitu. Tokoferoly působí jako antioxidanty tím, že přerušují řetězové reakce volných radikálů zásluhou své schopnosti přenášet vodík fenolové skupiny na volný peroxylový radikál peroxidované polynenasycené mastné kyseliny. Touto reakcí vznikne oxidovaný tokoferolový radikál. Většina oxidovaného tokoferolu se regeneruje redukcí na tokoferol. K redukcí slouží buď vitamin C, nebo glutathion. Tokoferolový radikál může také reagovat s dalším peroxylovým radikálem. Vznikne látka typu chinonu, zbavená nepárového elektronu, této struktury:



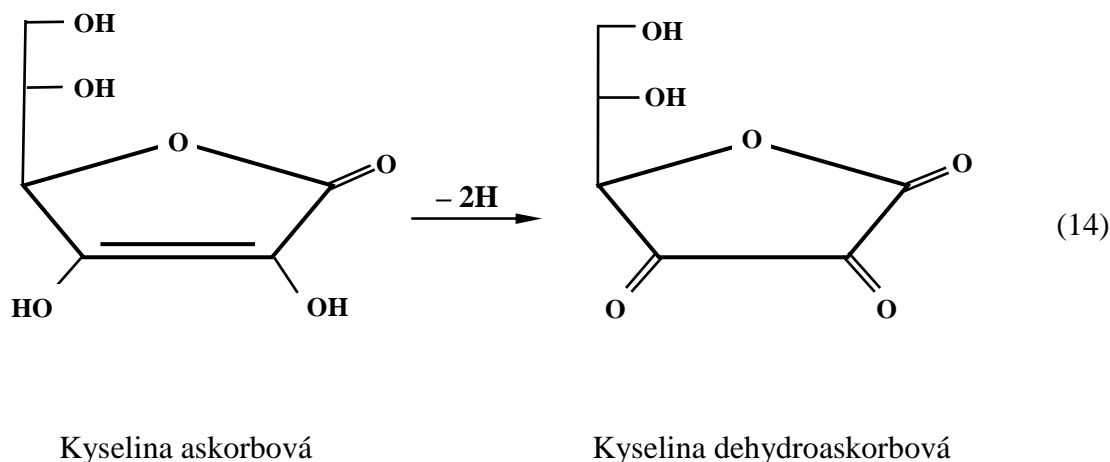
Oxidační produkt α -tokoferolu.

Uvedený produkt není regenerovatelný. V játrech je navázán na kyselinu glukuronovou a vyloučen do žluče. Fyziologická potřeba vitaminu E (u člověka asi 20 mg/den) se zvyšuje při větším alimentárním příjmu nenasycených lipidů a při namáhavých sportovních výkonech. Jeho hlavním zdrojem je rostlinná strava a běžně se přidává do rostlinných olejů.

6.6. Vitamin C

Vitamin C (kyselina L-askorbová) je látka odvozená od sacharidů (enolisovaný lakton kyseliny L-gulonové). Je dobře rozpustný ve vodě a v buňce působí v cytosolu. Kromě toho, že je antioxidantem, má další biochemické role, např. při syntéze kolagenu. Zařazení kyseliny askorbové mezi vitaminy je záležitostí tradice, jeho potřeba (aspoň 50 - 70 mg/den) je větší než u vitaminů bývá. Kromě toho většina živočichů si jej dokáže syntetizovat. Člověk však nemá enzym, který katalyzuje poslední krok syntézy. Role vitaminu C je podobná jako u vitaminu E, neuplatňuje se však v membránách, ale ve vodné fázi buněčného prostředí a extracelulárních tekutin. Odhaduje se, že přispívá až 30-ti % k celkové antioxidační kapacitě

plasmy (Benzie, 2000). Dokáže přímo reagovat se superoxidovým radikálem, hydroxylovým radikálem a singletovým kyslíkem. Produktem reakce je kyselina dehydroaskorbová:

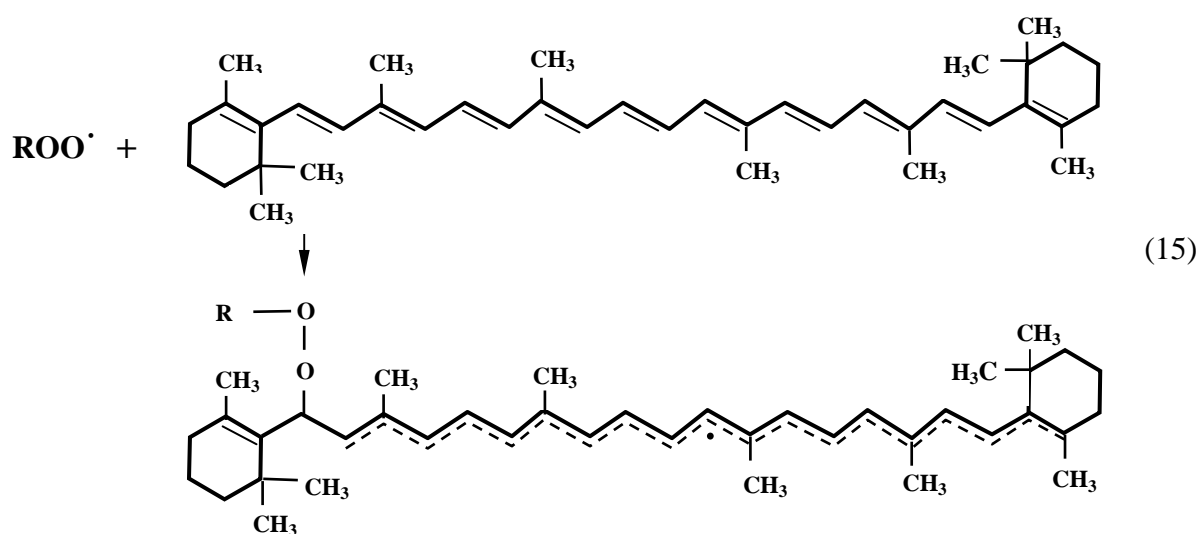


Z kyseliny dehydroaskorbové se vitamin C může regenerovat účinkem dehydroaskorbát reduktasy. Reakcí s ionty NO_2^- brání vitamin C vzniku nebezpečných nitrosaminů. Tím, že regeneruje oxidovaný tokoferol, nepřímo přispívá k prevenci peroxidace lipidů. Pokud by v prostředí byla vysoká koncentrace volných iontů přechodových kovů (Fe, Cu), pak by vitamin C působil jako prooxidant (Diplock a kol., 1998). Jak již bylo zmíněno v 5. kapitole, oxidační poškození DNA, lipidů a proteinů bylo signifikantně větší u osob s koncentrací vitaminu C v plasmě menší než $50 \mu\text{mol/l}$. Soudobá dietní doporučení navrhují jeho alimentární příjem zvýšit na cca 120 mg/den .

6.7. Karoteny

Významnými antioxidanty jsou karoteny, které jsou provitaminy A, nacházející se v rostlinách. Obsahují konjugované *trans*-dvojně vazby, které absorbují světlo a odpovídají za oranžové zbarvení. V rostlinách karoteny doprovází stovky příbuzných barevných látek se skupinovým označením **karotenoidy** (Thurnham a Northrop-Clewes, 1999). Karotenoidy jsou normální složkou krve a tkání člověka a řady živočichů. Z nich je možno uvést β - a α -karoten, kryptoxanthin, lykopen a lutein. Lutein a zeaxanthin jsou přítomny v pigmentu oční sítnice, s funkcí antioxidantů. Při odpovídající výživě se u člověka 80 - 85% karotenoidů nachází v tukové tkáni, 8 - 12% v játrech, 2 - 3% ve svalu a menší množství v dalších tkáních. U člověka se na vitamin A přeměňují karoteny a kryptoxanthin, u ptáků a ryb také xantophyly (Bendich a Olson, 1989).

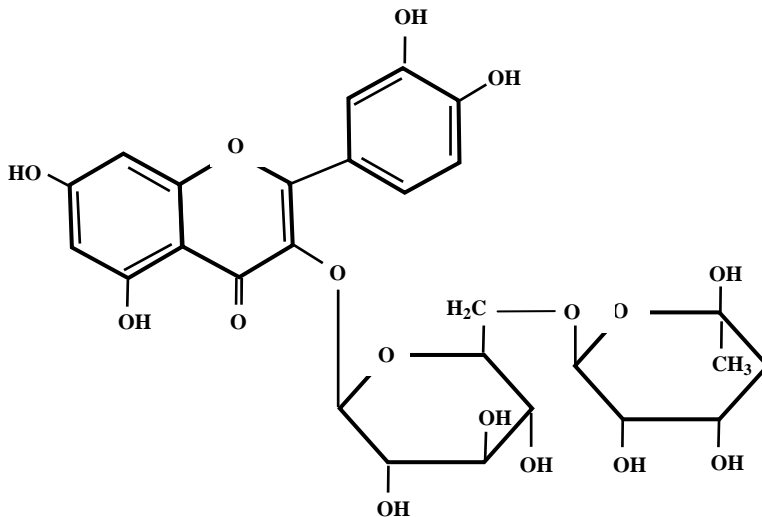
Karoteny jsou hydrofobní povahy, dobře rozpustné v tucích. Studium antioxidačních účinků se soustředilo na **β-karoten**, jehož význam je větší než α- a γ-karotenu. V plasmě β-karoten představuje 15 – 30% přítomných karotenoidů (Bendich a Olson, 1989). Role β-karotenu spočívá ve vychytávání volných kyslíkových radikálů ve tkáních při nízkém, parciálním tlaku O₂. Jeho účinek se doplňuje s účinkem vitamínu E, který je účinný při vyšších koncentracích kyslíku. Zakládá se na stabilizaci peroxylových radikálů vlivem konjugované alkylové struktury (Burton a Ingold, 1984). Teoreticky tuto schopnost mají i další karotenoidy s podobným systémem dvojných vazeb, zájem výzkumu se však zatím soustřeďoval na karoteny.



Kromě uvedené schopnosti dokáží karoteny „zhášet“ singletový O₂, tj. mohou jej převádět do stabilního, tripletového stavu.

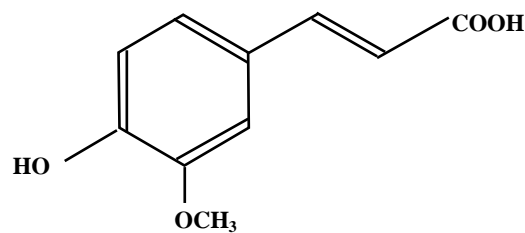
6.8. Flavonoidy

Flavonoidy jsou velkou skupinou polyfenolických antioxidantů v ovoci, zelenině, čaji a vínu. Je známo několik tisíc těchto látek, vyskytujících se v rostlinách vesměs v podobě β-glykosidů (Scalbert a Williamson, 2000). Mají vynikající schopnost vychytávat všechny volné radikály. Oxidují se přitom na radikálové sloučeniny a rozpadají se. Z trávicího traktu se vstřebávají neúplně (Hollman a Katan, 1999). Játra je z krevního oběhu stahují a detoxikují konjugační reakcí tak jako jiné fenolické látky. Známým flavonoidem je např. **rutin** obsažený v pohance. Jeho aglykon tvoří flavonoid **kvercetin**, glykosidickou část rutinosa, což je disacharid tvořený glukosou a rhamnosou:



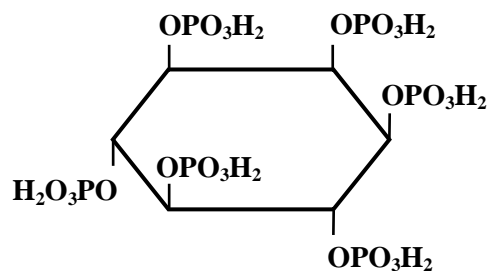
6.9. Jiné antioxidanty alimentárního původu

K antioxidantům rostlinného původu patří **kyselina ferulová**:



Tato jednoduchá fenolická látka je součástí buněčných stěn. Vyskytuje se např. v cereáliích a zelenině, vázána na polysacharidy. Ve velkém množství je vázána v řepném pektinu. Kyselina ferulová a další fenolové látky zcela jistě souvisí s vysokou antioxidační účinností polysacharidů izolovaných z pšeničných otrub, pohankových slupek a různých léčivých rostlin (Hromádková, 2006). Kyselina ferulová má řadu průmyslových aplikací. Používá se také v kosmetických přípravcích, například v opalovacích krémech a přípravcích, které zpomalují stárnutí kůže a tvorbu vrásek. Kyselina ferulová snadno tvoří stabilní fenoxylradikály, čímž ukončuje radikálové řetězové reakce (Graf, 1992).

V semenech rostlin je obsažena **kyselina fytová** (*myo*-inositolhexafosforečná):



V trávicím traktu brání vzniku reaktivních forem O_2 tím, že pevně váže železo, které jejich vznik katalyzuje. Viz Fentotova reakce (č. 2). Železo také katalyzuje reakci Haber-Weissovu (reakce č. 4). Kyselina fytoová nevychytává radikály vzniklé v jiných reakcích. O kyselině fytoové bylo podrobně pojednáno v předchozí studii Vědeckého výboru výživy zvířat „Význam kyseliny fytoové ve výživě zvířat a lidí a důsledky její přítomnosti v krmivech a potravinách“ (2004).

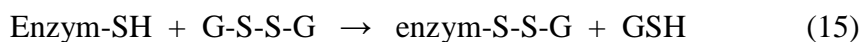
K antioxidantům se řadí také **mannitol**, dále **zinek** (Powell, 2000), jednak tím, že tvorbou komplexů stabilizuje SH-skupiny proteinů a chrání je tím před oxidací, také však tím, že vytěsňuje nadbytečnou měď a železo z různých vazebných míst, což následně vede k jejich precipitaci v cytosolu. Chronický nedostatek Zn zvyšuje oxidační poškození buněčných struktur. Vlastnosti antioxidantu mají **β -glukany** z kvasinek (Kogan, 2006) a **plasmatické bílkoviny** (Bergendi a Ferenčík, 1988).

6.10. *Glutathion*

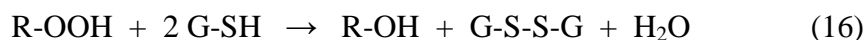
Glutathion je jednoduchá thiolová sloučenina, tripeptid složený z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Je snáze oxidovatelný než thiolové skupiny (-SH) proteinů, proto je oxidován přednostně a důležité proteiny (enzymy) jsou takto chráněny (Halliwell, 1979). Dokáže dokonce reaktivovat enzymy oxidačně poškozené. Oxidací vzniká disulfidická vazba:



Oxidovaný glutathion se může regenerovat účinkem glutathion reductasy, která využívá vodík redukovaných pyridinových nukleotidů. Buňky udržují vysoký poměr G-SH/G-S-S-G. Zvlášť vysoká koncentrace glutathionu je nutná v oční sítnici, kde reaktivní formy O_2 vznikají snáze než v jiných tkáních (vliv světla). Zde nutno poznamenat, že přímá reakce O_2 s SH-skupinami enzymů nebo i glutathionu je velmi pomalá, je však značně urychlena v přítomnosti iontů kovů, které jsou v biologických systémech vždy přítomny. Je to další důvod k tomu, aby organismus udržoval koncentraci volných iontů Fe a Cu na nízké úrovni. Rovněž je třeba zmínit, že pro všechny formy života není glutathion nezbytný. Některé aerobní bakterie glutathion netvoří, avšak mohou jej zastoupit jiné thiolové sloučeniny. Naproti tomu u člověka vede porucha syntézy glutathionu k závažnému onemocnění. Pokud glutathion reductasa nestačí redukovat oxidovaný glutathion, poměr G-SH/G-S-S-G klesá a vzniká nebezpečí, že budou inaktivovány některé enzymy tvorbou smíšených disulfidů:



Jak již bylo zmíněno v kapitole 6.2, glutathion je zdrojem elektronů pro glutathion peroxidasu. Je proto důležitý pro odstraňování peroxidu vodíku (reakcí č. 10) i hydroperoxidů lipidů:



6.11. Další nízkomolekulární antioxidanty

Vlastnosti antioxidantů mají i některé další látky, které jsou podobně jako glutathion endogenního původu. Je to kyselina močová, produkt degradace purinových basí a bilirubin, produkt degradace hemoglobinu. Obě látky působí jako „zhášače“ singletového kyslíku (Bergendi a Ferencík, 1988).

6.12. Je antioxidant také CLA?

Konjugovanou kyselinou linolovou (CLA) se rozumí směs isomerů kyseliny linolové (C 18:2) s dvojicí dvojných vazeb, které nejsou odděleny methylenovou skupinou. Převládající isomery jsou *cis*-9, *trans*-11 a *trans*-10, *cis*-12. CLA má řadu vesměs příznivých fyziologických účinků. Některé práce naznačují, že snižuje peroxidaci lipidů a má tudíž vlastnosti antioxidantu. Vyplývá to z výsledků pokusů s potkany (Kim a kol., 2005), kdy přidavek CLA snižoval thiobarbiturové číslo jaterní tkáně při dietě bez vitamínu E. V pokusech s králíky, přidavek CLA zvýšil oxidační stabilitu masa (Corino a kol. 2002).

7. Antioxidanty ve výživě zvířat

Antioxidanty se do krmných směsí běžně přidávají. Důvodem je snaha ochránit labilní sloučeniny, např. polynenasycené mastné kyseliny a karoteny před oxidací (antioxidanty BHA, BHT) a zvýšit oxidační stabilitu živočišných produktů (vitamin E, selen). Zvýšení oxidační stability živočišných produktů je v zájmu prodejců i spotřebitelů. V zájmu spotřebitelů je i zvýšení nutriční hodnoty potravin dané vyšším obsahem vitamínu E a selenu (Se). Je logické, že této problematice se věnuje velká pozornost.

7.1. Podávání vitamínu E

Zvířata na pastvě jsou dobře zásobena antioxidanty a jejich antioxidační status je lepší než při běžném krmení siláží a koncentrátem (Gatellier a kol., 2004). Skot na pastvě měl vyšší koncentraci vitamínu E v mase, vyšší aktivitu superoxid-dismutasy a naopak nižší aktivitu superoxid-peroxidasy. Nižší aktivita glutathion peroxidasy zřejmě souvisela s tím, že ve zkrmovaném koncentrátu bylo více Se než v píci.

Nutriční požadavek hospodářských zvířat na vitamin E je cca 10 mg/kg sušiny krmiva (Anon., 1973). Existuje větší počet prací, v nichž autoři sledovali vliv zvýšeného přídatku vitaminu E, který bývá podáván ve formě α -tokoferolacetátu na oxidační stabilitu masa. Eikelenboom a kol. (1999) podávali denně 2 g vitaminu E žírným býkům na směsné krmné dávce. Podávání vitaminu E významně snížilo oxidaci lipidů vyjádřenou thiobarbiturovým číslem (TBARS). Přídavek vitaminu E neovlivnil stabilitu barvu masa. Kirchheim a kol. (2000) se zabývali přídatkem vyšších dávek vitaminu E žírným býkům, telatům a prasatům. Pozorovali zvýšení koncentrace vitaminu E v játrech, tuku i mase. Vliv přídatku byl méně výrazný v případě masa než u tuku a jater. Zaznamenali příznivý vliv vitaminu E na oxidační stabilitu a barvu masa. Oxidační stabilita byla podáním vitaminu E zvýšena v mase býků, rovněž obsah vitaminu E v plasmě i mase (O'Grady a kol., 2001). U telat v období mléčné výživy přídavek vitaminu E (500 mg/den) zvýšil obsah vitaminu E v plasmě, svalu i dalších tkáních (Engeseth a kol., 1993). Zlepšil oxidační stabilitu masa (TBARS), přičemž jeho účinek byl výraznější u syrového masa ve srovnání s vařeným. V této práci bylo prokázáno i snížení tvorby oxidů cholesterolu ve vařeném mase vlivem vitaminu E. Inverzní vztah mezi obsahem vitaminu E v mase a jeho náchylností k lipoperoxidaci byl prokázán i u masa jehněčího (Salvatori a kol., 2003).

Další práce je dokladem skutečnosti, že vliv vitaminu E na oxidační stabilitu masa nemusí být průkazný. Eichenberger a kol. (2004) přidávali ke krmné směsi pro prasata vitamin E (+ 200 mg/kg) a vitamin C (+ 300 mg/kg). Vitamin E neměl na peroxidaci lipidů vliv, vitamin C ji paradoxně zvýšil. Obsah obou vitaminů ve svalové tkáni byl však zvýšen.

Nelze přehlédnout hodnotné práce o vlivu přídatku vitaminu E do krmných směsí brojlerových kuřat. Eder a kol. (2005) základní směsi s obsahem 9 mg vitaminu E/kg doplnili vitaminem E (+ 20, 40 a 200 mg/kg). Základní směsi obsahovaly palmový, sojový či lněný olej, tj. oleje s rozdílným obsahem nenasycených lipidů. Zvýšení obsahu vitaminu E v mase bylo nejvíce patrné u kuřat krmených směsí s palmovým olejem, zjevně proto, že část vitaminu E se spotřebovala v průběhu likvidace peroxylových radikálů. Koncentrace zplodin oxidace (TBARS) byla nejnižší u kuřat na dietě s palmovým olejem, (který obsahuje nejméně nenasycených mastných kyselin). Naopak nejvyšší byla u diety s lněným olejem, (který obsahuje nejvíce nenasycených mastných kyselin, zejména oxilabilní kyseliny linolenové). Vitamin E tvorbu TBARS snižoval. Tepelná úprava masa zvýšila tvorbu oxidačních produktů lipidů, včetně oxidačních zplodin cholesterolu. K obdobným výsledkům dospěli Cortinas a kol. (2006). Ukládání vitaminu E v mase kuřat se zvyšovalo s jeho koncentrací v krmivu (0 až 400 mg/kg) a klesalo s obsahem polynenasycených mastných kyselin v krmné směsi

(15 až 61 g/kg). Jiná práce ukazuje, že zvýšená koncentrace vitamínu E v krmné směsi kuřat (200 - 400 mg/kg) snižuje tvorbu oxidačních produktů cholesterolu v době, která uplyne mezi porážkou a prodejem (Kim a kol., 2006). V důsledku podání vitamínu E se zvýšila jeho koncentrace v masě (až na 19 mg v kg masa stehna), potažmo i oxidační stabilita masa vyjádřená jako TBARS.

Existují i práce, které se zabývají vlivem přídatku vitamínu E králíkům (Castellini a kol., 1999; Corino a kol., 1999; Dal Bosco a kol., 1999; Castellini a kol., 2000; Skřivanová a kol., 2001). Bez výjimky konstatují lepší oxidační stabilitu masa králíků, kteří v dietě dostávali doplněk vitamínu E. Corino a kol. (1999) uvádí i lepší stabilitu barvy masa. Castellini a kol. (2000) navíc pozorovali synergický účinek současného přídatku vitamínu C, který prokazatelně zpomaloval úbytek vitamínu E při skladování masa při 4°C. O výsledcích práce Skřivanové a kol. (2001) je blíže pojednáno v kapitole 8.4.

7.2. Podávání selenu

Primárním důvodem pro zařazení selenu do krmných dávek hospodářských zvířat je snaha odstranit jeho deficit daný nízkým obsahem Se v půdě, následně v rostlinách na této půdě pěstovaných. Selen je prvek nezbytný pro život, součást selenoproteinů z nichž nejvýznamnější je glutathion peroxidasa. Korunová a kol. (1993) uvádějí na základě měření obsahu Se v séru, že ve středních Čechách je zásobení obyvatelstva selenem nedostatečné. V roce 1999 byl příjem Se v české populaci asi 37 µg/osobu a den (Ruprich a Řehůřková, 2003), zatímco doporučený příjem činí 55 µg/den (Rayman, 2004). Nedostatek selenu je aktuální i ve výživě zvířat (Pavlata a kol., 2000, 2002), může být však zmírněn importem např. sóji ze zámoří, z oblastí, kde obsah Se v půdě je vyšší. Nutriční požadavek většiny živočišných druhů na Se je cca 0,1 mg/kg. Je nesnadné určit jej přesně, protože závisí na současné přítomnosti vitamínu E, s kterým je částečně zastupitelný. K posouzení zásobení organismu selenem je vhodné stanovení aktivity glutathion peroxidasy, protože koncentrace Se v plasmě indikuje spíše momentální příjem (Pavlata a kol., 2000). Ke stejnému účelu Kursa a Kroupová (1975) použili stanovení Se v srsti.

Hlavní formou Se v rostlinách je selenomethionin. Snadno se zabudovává do bílkovin na místo methioninu, neboť příslušná t-RNA mezi oběma sloučeninami nerozlišuje. Selenomethionin je hlavní formou Se také v selenových kvasnicích, které jsou komerčně dostupné a kterými se obsah Se v krmných dávkách může zvýšit. Seleničitan sodný je levnější, jeho biologická dostupnost je však nižší. Leng a kol. (2003) u kuřat krmných směsí s doplňkem selenových kvasnic a seleničitanu zjistili lepší ukládání Se v tkáních při použití

organické formy Se. Aktivita glutathion peroxidasy byla dotací Se zvýšena, rozdíl mezi organickou a anorganickou formou Se však byl malý. K stejnému závěru došli i Gunter a kol. (2003). Doplněk selenových kvasnic více zvýšil koncentraci Se v krvi, než doplněk seleničitanu, aktivity glutathion peroxidasy se však nelišily. Boldižárová a kol. (2003) však na základě pokusů s ovci poukazují na to, že seleničitan intravenosně podaný se rychle vylučuje močí. Vlastnosti antioxidantu mohou mít i syntetické sloučeniny Se (Talas a kol., 2006). Ve vyšších dávkách je však Se toxický, působí jako prooxidant a jeho koncentrace v krmivu je limitována na 0,5 mg/kg.

Z velkého počtu prací o Se u zvířat je níže uveden výběr těch, které se zabývají jeho antioxidačními účinky.

Scholz a kol. (1981) hledali u telat v mléčném výkrmu souvislost mezi alimentárním příjmem Se a aktivitou glutathion peroxidasy. Při zvýšení obsahu Se v dietě z 0,03 na 0,23 mg/kg se aktivita enzymu v krvi i tkáních výrazně zvýšila, při dalším zvýšení obsahu Se v krmivu se zvyšovala jen málo. V krvi byla aktivita glutathion peroxidasy vyšší než v tkáních. Sníženou aktivitu glutathion peroxidasy při nedostatku Se v dietě telat věku 7 měsíců pozorovali Walsh a kol. (1993). V pokuse s jehňaty byla doplňkem Se zvýšena aktivita glutathion peroxidasy v krvi, ovšem až po několika týdnech podávání (Molnár a kol., 1998). Vztah mezi zásobením zvířat Se a aktivitou glutathion peroxidasy lze v krvi snáze prokázat než v mase. U masného skotu zvýšení obsahu Se v dietě z 0,1 na 0,4 mg/kg neovlivnilo aktivitu glutathion peroxidasy v mase, ani nesnížilo oxidaci lipidů (O'Grady a kol., 2001). Tím, že aktivita glutathion peroxidasy v mase je nepoměrně nižší než v krvi, je její stanovení obtížnější a snáze ovlivněno dalšími faktory. Korelaci mezi obsahem Se v mase různých zvířat a aktivitou glutathion peroxidasy uvádějí Daun a kol. (2001) a Daun a Åkesson (2004ab).

V případě kuřat stojí za zmínku práce Holovské a kol. (2003). Z toho, že nebyl zjištěn vliv příjmu Se na aktivitu glutathion peroxidasy v játrech, autoři usuzují, že pro její syntézu postačuje i základní koncentrace Se v krmivu (0,1 mg/kg). S tím souhlasí i výsledky, které uvádějí Payne a Southern (2005). V pokusech na kuřatech zjistili dobré ukládání Se, podaného jako selenové kvasnice (+ 0,30 mg Se/kg) do svalové tkáně, nepozorovali však ovlivnění glutathion peroxidasové aktivity.

Praktickým důsledkem podávání Se a zvýšení glutathion peroxidasové aktivity by mělo být zvýšení oxidační stability masa. Bobček a kol. (2004) přidali do krmné směsi prasat obsahující 0,18 mg Se/kg selenové kvasnice v množství odpovídajícím 0,30 mg Se/kg. V mase pokusných prasat bylo 2,2 - 2,6x víc Se než v mase prasat kontrolních. Peroxidace

lipidů, vyjádřená jako TBARS, v mase pokusných prasat se snížila na 46 - 70% kontrolní hodnoty. O'Grady a kol. (2001) však uvádějí, že obsah Se v krmivu má malý vliv na oxidační stabilitu masa, snad vyjma situace, kdy příjem Se je velmi malý.

8. Související pokusy uskutečněné ve VÚŽV

8.1. *Obsah selenu v tkáních a jejich antioxidační status u telat krmených dietou s doplňkem selenových kvasnic*

a) *Metodika*

K tomuto pokusu jsme použili 12 býčků (Holstein) věku 3 - 4 týdny. Krmnou dávku tvořila mléčná náhražka Telasan V (Bodit Tachov) a startérový koncentrát Telstar (Zea Sedmihorky). Mléčná náhražka byla podávána 2x denně à 0,4 kg v 3 l vody. Startér byl dostupný *ad libitum* a jeho spotřeba byla měřena. Telata byla rozdělena na skupinu kontrolní a pokusnou. Kontrolní dieta obsahovala v průměru 0,13 mg Se/kg, což je víc než nutriční požadavek (0,10 mg Se/kg). Pokusná dieta byla doplněna selenovými kvasnicemi Sel-Plex (Alltech) tak, aby výsledný obsah Se činil 0,50 mg/kg. Za 125 dnů byla zvířata poražena, odebrány vzorky jaterní a ledvinové tkáně a zmrazeny. Byly rovněž odebrány vzorky srsti. Po uplynutí 24 h byly odebrány vzorky *m. longissimus thoracis et lumborum* (MLT) a zmrazeny. Současně bylo změřeno pH a odkap v periodě 24 - 48 h *post mortem*.

Sušina vzorků byla stanovena při 105°C, celkový protein a tuk na přístrojích Kjeltec AUTO 1030 Analyser a Soxtec 1043 /Tecator), popel při 550°C. Vzorky na stanovení Se byly mineralizovány HNO₃ + H₂O₂ v mikrovlnné peci Milestone Ethos TC. Selen byl v mineralizátu měřen metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji Sollar M-6 (TJA Solutions). Postup byl validován použitím certifikovaného referenčního materiálu RM 8414 Bovine Muscle (NIST). Barva masa (L*, a*, b*) byla měřena na přístroji Minolta CR-300.

Oxidace lipidů ve vzorcích MLT byla měřena thiobarbiturátovou metodou (Piette a Raymond, 1999). Výsledky byly vyjádřeny v mg malondialdehydu/kg svalu. Aktivita glutathion peroxidasy byla zjištěna s použitím terciárního butyl hydroperoxidu jako substrátu spřaženou reakcí, při níž se měří oxidace NADPH podle poklesu absorbance při 340 nm. Byla vyjádřena v μmol NADPH oxidovaného za 1 minutu 1 g tkáně (DeVore a Greene, 1982; Hernández a kol., 2004). Aktivita katalasy byla měřena z úbytku H₂O₂, při 240 nm a vyjádřena v μmol H₂O₂ rozloženého za 1 minutu 1 g tkáně (Aebi, 1983).

Signifikance rozdílů mezi skupinami byla určena t-testem.

b) Výsledky

Telata pokusné skupiny měla větší přírůstek tělesné hmotnosti (+ 2,9 kg) a spotřebovala více startéru (+12,1 kg) než telata kontrolní. Rozdíl nedosáhl statistické významnosti (Tab. 1).

Tab. 1. Příjem krmiva a růst telat¹ kontrolní skupiny s doplňkem selenu².

	Kontrola	Se
Příjem (kg)		
mléčné náhražky	100	100
startéru	233 ± 22	245 ± 24
Hmotnost telat (kg)		
počáteční	57,5 ± 5,7	58,6 ± 6,1
konečná ³	173,0 ± 15,0	177,0 ± 13,9
Přírůstek hmotnosti (kg)	115,5 ± 9,8	118,4 ± 9,0

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině

² Sel-Plex

³ Trvání pokusu 125 dnů.

Obohacení diety selenem neovlivnilo pH, odkap, chemické složení masa, ani jeho barvu (Tab. 2).

Tab. 2. Kvalita masa (*m. longissimus thoracis et lumborum*) telat¹ kontrolní skupiny a s doplňkem selenu².

	Kontrola	Se
pH _{24h}	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,3
Odkap _{24h} (%)	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,2
Sušina (g/kg)	228 ± 3	227 ± 7
Protein (g/kg)	200 ± 3	202 ± 4
Tuk (g/kg)	5,1 ± 1,6	5,7 ± 2,2
Popel (g/kg)	10,2 ± 0,3	10,4 ± 0,4
Cholesterol (g/kg)	0,75 ± 0,07	0,68 ± 0,05
Světlost (L*)	39,9 ± 2,1	36,7 ± 4,5
Červenost a*)	14,9 ± 2,0	13,4 ± 1,8
Žlutost (b*)	3,6 ± 2,5	2,5 ± 0,9

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině.

² Sel-Plex

Doplňěk Se zvýšil koncentraci Se v játrech a ledvinách o 19,1 a 5,6%. Koncentrace Se v MLT, exkrementech a srsti byly u pokusné skupiny zdvojnásobeny (Tab. 3).

Tab. 3. Koncentrace Se (mg/kg) v mase (*m. longissimus thoracis et lumborum*), játrech, ledvinách, výkalech a srsti telat¹ kontrolní skupiny a skupiny s doplňkem selenu².

	Kontrola	Se
Maso	0,35 ± 0,08	0,69 ± 0,10*
Játra	1,57 ± 0,68	1,87 ± 0,46
Ledviny	2,51 ± 0,26	2,65 ± 0,30
Výkaly	0,94 ± 0,28	2,13 ± 0,69*
Srst	1,62 ± 0,29	3,09 ± 0,57*

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině.

² Sel-Plex

* Významný rozdíl proti kontrole (P < 0,05).

Aktivita glutathion peroxidasy v játrech pokusných telat byla signifikantně zvýšena, v tkáni svalu však ovlivněna nebyla (Tab. 4).

Tab. 4. Aktivita glutathion peroxidasy (GSH-Px) a katalasy v mase a játrech, a tvorba látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) v *m. longissimus thoracis et lumborum* telat¹ kontrolní skupiny a skupiny s doplňkem selenu².

	Kontrola	Se
GSH - Px v mase ³	0,41 ± 0,13	0,42 ± 0,11
GSH - Px v játrech ³	2,89 ± 0,33	5,61 ± 0,63 *
Katalasa v mase ⁴	48,3 ± 4,3	48,0 ± 5,1
Katalasa v játrech ⁴	3380 ± 490	3481 ± 206
TBARS (mg MDA/kg)		
Den 0	0,07 ± 0,04	0,09 ± 0,05
Den 3	0,38 ± 0,24	0,18 ± 0,06
Den 6	0,95 ± 0,59	0,41 ± 0,21

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině.

² Sel-Plex

³ μmol NADPH oxidovaný za 1 min. 1 g tkáně.

⁴ μmol H₂O₂ rozložený za 1 min. 1 g tkáně.

MDA, malondialdehyd

* Významný rozdíl proti kontrole (P < 0,05).

Nebyl pozorován vliv diety na aktivitu katalasy. Přídavek Se zlepšil oxidační stabilitu masa vyjádřenou jako TBARS při skladování po dobu 3 a 6 dnů (4°C). Účinek však vzhledem k rozptylu nálezů nebyl signifikantní.

8.2. Vliv přídavku selenu a vitamínu E do krmné dávky telat na kvalitu masa

a) Metodika

K pokusu jsme použili 18 býčků plemene Holstein, věku 3 - 4 týdny na začátku pokusu. Krmnou dávku představoval Telasan V s doplňkem 4% lněného semene a Telstar, podobně jako v předchozím pokuse. Stejně jako v předchozím pokuse byl Telasan V podáván 2x denně 0,4 kg a Telstar byl nabídnout *ad libitum*, přičemž jeho spotřeba byla měřena. Šest telat kontrolní skupiny mělo základní dietu v níž koncentrace Se v závislosti na spotřebě startéru se pohybovala mezi 0,095 mg/kg na začátku pokusu a 0,128 mg/kg na konci. Obdobně, koncentrace vitamínu E kolísala mezi 30 a 33 mg/kg. Dalších 6 telat mělo základní dietu doplněno přídavkem selenových kvasnic Sel-Plex, čímž byl obsah Se zvýšen na 0,50 mg/kg. Šest telat poslední skupiny měl rovněž zvýšen obsah Se v dietě na 0,50 mg/kg, navíc přídavkem acetátu tokoferolu byl obsah vitamínu E zvýšen na 100 mg/kg. Po uplynutí 105 dní byla telata porážena. Tři týdny před porážkou se uskutečnil bilanční pokus při němž telata dostávala 2x denně 0,2 g Cr₂O₃ a po 5 dnů byly sbírány výkaly.

Po porážce byly odebrány vzorky srsti, tkáně, jater a ledvin a zmrazeny na -40°C (na -70°C pro enzymová stanovení). Vzorky svalové tkáně (*m. longissimus thoracis et lumborum*) byly odebrány 24 h *post mortem*. Použité analytické metody byly popsány v kapitole 8.1. Vitamin E byl stanoven podle evropské normy EN 12822 (2000). Po zmýdelnění byl extrahován diethyl etherem a stanoven na kapalinovém chromatografu Shimadzu VP.

K statistickému vyhodnocení byla použita jednoduchá analýza variace (ANOVA) a Tukey test k zjištění statistické významnosti rozdílů mezi skupinami.

b) Výsledky

Telata kontrolní skupiny, skupiny s doplňkem Se a s doplňkem Se a vitamínu E zvýšila v průběhu pokusu hmotnost průměrně o 114,3, 118,6 a 119,3 kg. Vliv diety na rychlost růstu, příjem startéru, stravitelnost sušiny a Se nebyl statisticky významný (Tab. 5). V příjmu startéru byly mezi jednotlivými telaty v tomto pokuse velké rozdíly. Stravitelnost Se se v pokusných skupinách blížila 70ti %, což je více než se uvádí u dospělého skotu (Harrison a Conrad, 1984).

Tab. 5. Příjem krmiva, růst a stravitelnost sušiny a selenu u telat¹ kontrolní skupiny, skupiny s doplňkem selenu² a selenu s vitamínem E.

	Kontrola	Se	Se + vitamín E
Příjem (kg)			
mléčné náhražky	84	84	84
startéru	234 ± 128	204 ± 131	234 ± 130
Hmotnost telat (kg)			
počáteční ³	48,2 ± 5,7	48,1 ± 6,0	48,5 ± 4,7
konečná ⁴	163,5 ± 19,8	166,7 ± 23,5	167,8 ± 14,3
Stravitelnost (%)			
sušiny	68,5 ± 4,3	71,6 ± 3,3	69,8 ± 4,4
selenu	66,6 ± 4,6	69,3 ± 6,8	69,2 ± 2,5

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině.

² Sel-Plex

³ Ve věku 26 dnů.

⁴ Ve věku 131 dnů.

Přídavek vitamínu E zvýšil koncentraci vitamínu E v mase o 69%. Ostatní parametry kvality masa nebyly složením diety ovlivněny (Tab. 6).

Tab. 6. Kvalita masa (*m. longissimus thoracis et lumborum*) telat¹ kontrolní skupiny, skupiny s doplňkem selenu² a selenu s vitamínem E.

	Kontrola	Se	Se + vitamín E
pH _{24h}	5,6 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,5 ± 0,1
Odkap _{24h} (%)	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,4
Sušina (g/kg)	229 ± 13	228 ± 6	231 ± 7
Protein (g/kg)	202 ± 9	203 ± 4	205 ± 7
Tuk (g/kg)	5,5 ± 1,6	6,6 ± 2,4	5,6 ± 2,0
Popel (g/kg)	10,5 ± 0,4	10,2 ± 0,2	10,5 ± 0,1
Hydroxyprolin (g/kg)	0,53 ± 0,05	0,51 ± 0,02	0,51 ± 0,07
Cholesterol (g/kg)	0,58 ± 0,04	0,54 ± 0,04	0,53 ± 0,02
Vitamín E (mg/kg)	0,32 ± 0,06 ^a	0,33 ± 0,05 ^a	0,54 ± 0,13 ^b
Světlost (L*)	46,1 ± 3,6	46,7 ± 3,1	47,3 ± 4,7
Červenost (a*)	7,9 ± 2,1	7,0 ± 1,6	7,0 ± 2,0
Žlutost (b*)	11,9 ± 1,5	12,0 ± 1,3	11,6 ± 1,3

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině.

² Sel-Plex

^{ab} Hodnoty s rozdílným indexem jsou významně odlišné (P < 0,05).

Přídavek Se signifikantně zvýšil obsah Se v mase na více než dvojnásobek, rovněž zvýšil obsah Se ve výkalech a srsti. Zvýšení obsahu Se v tkáni jater a ledvin bylo méně výrazné a statisticky nevýznamné (Tab. 7).

Tab. 7. Koncentrace Se (mg/kg) v mase (*m. longissimus thoracis et lumborum*), játrech, ledvinách, výkalech a srsti telat¹ kontrolní skupiny, skupiny s doplňkem selenu² a selenu s vitamínem E.

	Kontrola	Se	Se + vitamin E
Maso	0,21 ± 0,04 ^a	0,43 ± 0,05 ^b	0,48 ± 0,05 ^b
Játra	1,50 ± 0,08	1,75 ± 0,10	1,68 ± 0,23
Ledviny	0,92 ± 0,35	1,16 ± 0,23	1,14 ± 0,22
Výkaly	0,67 ± 0,13 ^a	1,29 ± 0,34 ^b	1,27 ± 0,31 ^b
Srst	0,97 ± 0,09 ^a	1,65 ± 0,11 ^b	1,74 ± 0,19 ^b

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině.

² Sel-Plex

^{ab} Hodnoty s rozdílným indexem jsou významně odlišné (P < 0,05).

Aktivita glutathion peroxidasy v játrech byla až 10x vyšší než ve svalu (Tab. 8). U obou skupin telat s doplňkem Se byla signifikantně vyšší.

Tab. 8. Aktivita glutathion peroxidasy (GSH-Px) a katalasy v mase a játrech, a tvorba látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) v *m. longissimus thoracis et lumborum* telat¹ kontrolní skupiny, skupiny s doplňkem selenu² a selenu s vitamínem E.

	Kontrola	Se	Se + vitamin E
GSH-Px v mase	0,32 ± 0,05 ^a	0,50 ± 0,06 ^b	0,42 ± 0,05 ^b
GSH-Px v játrech	2,77 ± 0,72 ^a	4,63 ± 0,31 ^b	4,21 ± 0,35 ^b
Katalasa v mase	31,4 ± 5,2	34,0 ± 5,8	36,4 ± 3,9
Katalasa v játrech	5507 ± 986	5617 ± 621	6485 ± 781
TBARS (mg MDA/kg)			
Den 0	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Den 3	0,83 ± 0,20 ^a	0,75 ± 0,38 ^{ab}	0,45 ± 0,07 ^b
Den 6	2,22 ± 0,59 ^a	1,82 ± 0,74 ^{ab}	1,29 ± 0,21 ^b

Průměry ± S.D.

¹ 6 telat ve skupině.

² Sel-Plex

³ μmol NADPH oxidovaný za 1 min. 1 g tkáně.

⁴ μmol H₂O₂ rozložený za 1 min. 1 g tkáně.

MDA, malondialdehyd

^{ab} Hodnoty s rozdílným indexem jsou významně odlišné (P < 0,05).

V mase ani v játrech neměla dieta telat vliv na aktivitu katalasy. Přídavek vitamínu E významně zlepšil oxidační stabilitu masa. Vliv selenu byl malý a statisticky nevýznamný.

8.3. *Obsah selenu v tkáních, aktivita glutathion peroxidasy a oxidační stabilita masa králíků krměných dietou s doplňkem selenových kvasnic*

a) *Metodika*

K pokusu jsme použili 20 králíků genotypu Hyplus, odstavených ve věku 5 týdnů. Deset králíků bylo krmeno granulovanou krmnou směsí s obsahem 0,12 mg Se/kg. U deseti králíků byla tato krmná směs doplněna selenovými kvasnicemi Sel-Plex tak, aby se obsah Se zvýšil na 0,50 mg/kg. Králíci byli ustájeni individuálně a měli neomezený přístup ke krmivu. Poraženi byli ve věku 11 týdnů. Jateční výtěžnost byla měřena jako podíl komerčního jatečního trupu s hlavou, srdcem, játry a ledvinovým tukem z živé hmotnosti. Byly použity stejné laboratorní metody k analýze odebraných vzorků, které jsou již popsány v předchozích kapitolách.

b) *Výsledky*

Podobně jako v předchozích pokusech, ani u králíků jsme nezaznamenali vliv doplňku Se na růst, konverzi krmiva a jatečnou výtěžnost (Tab. 9).

Tab. 9. Růst, příjem krmiva, konverse krmiva a jateční výtěžnost u králíků¹ kontrolní skupiny a skupiny s doplňkem selenu².

	Kontrola	Se
Hmotnost (g)		
počáteční	1015 ± 19	1016 ± 25
konečná	2944 ± 319	2801 ± 302
Přírůstek (g)	1929 ± 320	1785 ± 305
Příjem krmiva (kg)	6,21 ± 0,96	5,56 ± 0,68
Konverse krmiva (kg/kg)	3,22 ± 0,14	3,11 ± 0,29
Jateční výtěžnost (%)	60,1 ± 1,3	60,0 ± 2,0

Průměrné hodnoty ± S.D.

¹ 10 králíků ve skupině.

² Sel-Plex

Maso hřbetu a stehna králíků pokusné skupiny obsahovalo 4x více Se než maso králíků kontrolních (Tab. 10).

Tab. 10. Sušina, tuk a obsah selenu v mase hřbetu a stehna králíků¹ kontrolní skupiny a skupiny s doplňkem selenu².

	Hřbet		Stehno	
	Kontrola	Se	Kontrola	Se
Sušina (g/kg)	250 ± 4	250 ± 4	267 ± 12	266 ± 11
Tuk (g/kg)	10,6 ± 1,5	8,7 ± 2,5	44,8 ± 13,8	37,7 ± 11,5
Se (μg/kg)	93 ± 3	400 ± 26*	98 ± 13	389 ± 34*

Průměrné hodnoty ± S.D.

¹ Analyzováno bylo maso 4 králíků z každé skupiny.

² Sel-Plex

* Významný rozdíl proti kontrole (P < 0,05).

Koncentrace Se v játrech a srsti převyšovaly koncentrace Se v mase. Doplňěk Se významně zvýšil koncentraci Se v játrech o 171% a v srsti o 242%. Aktivita glutathion peroxidasy v mase hřbetu nebyla doplňkem Se ovlivněna (Tab. 11).

Tab. 11. Koncentrace selenu v játrech, srsti a aktivita glutathion peroxidasy (GSH-Px) v mase hřbetu králíků¹ kontrolní skupiny a skupiny s doplňkem selenu².

	Kontrola	Se
Se v tkáni jater (μg/kg)	521 ± 58	1414 ± 48*
Se v srsti (μg/kg)	267 ± 33	914 ± 142*
GSH-Px v mase ³	1,29 ± 0,48	1,49 ± 0,50

Průměrné hodnoty ± S.D.

¹ Vzorky z 4 králíků z každé skupiny.

² Sel-Plex

³ μmol NADPH oxidovaný za 1 min. 1 g tkáně.

* Významný rozdíl proti kontrole (P < 0,05).

Rovněž nebyla zvýšena oxidační stabilita masa uloženého 3 a 6 dnů při teplotě 4°C (Tab. 12).

Tab. 12. Tvorba látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) v masě hřbetu a stehna králíků¹ kontrolní skupiny a skupiny s doplňkem selenu².

	Hřbet		Stehno	
	Kontrola	Se	Kontrola	Se
TBARS (mg MDA/kg)				
den 0	0,94 ± 0,04	0,80 ± 0,14	0,83 ± 0,20	0,95 ± 0,22
den 3	1,13 ± 0,26	1,13 ± 0,25	1,14 ± 0,17	1,73 ± 0,40
den 6	1,70 ± 0,46	1,59 ± 0,32	1,86 ± 0,44	2,28 ± 1,10

Průměrné hodnoty ± S.D.

¹ Vzorky z 4 králíků z každé skupiny.

² Sel-Plex

MDA, malondialdehyd

8.4. Oxidační stabilita masa králíků krmených dietou s doplňkem síranu měďnatého

a) Metodika

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv přídatku síranu měďnatého na růst a složení mastných kyselin lipidové frakce masa králíků. Králíci genotypu Hyplus byli odstaveni ve věku 5 týdnů. Síran měďnatý byl do granulované krmné směsi přidán v množství odpovídajícím 100 mg Cu/kg, vitamin E v množství 100 mg/kg. V kontrolní dietě bylo ca 9 mg Cu/kg. Králíci byli poraženi ve věku 11 týdnů. Z výsledků pokusu uvádíme pouze vliv tří diet na oxidační stabilitu masa. K jejímu zjištění bylo vzato maso stehna 6ti králíků z každé skupiny a uskladněno 3 a 6 dnů při teplotě 4°C. Látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou byly stanoveny klasickou destilační metodou (Tarladgis a kol., 1960), tj. odlišným postupem než v předchozích pokusech.

b) Výsledky

Měď podaná v množství, které mnohonásobně převyšovalo nutriční potřebu nejevila vlastnosti prooxidantu, neboť hodnoty TBARS byly stejné v masě stehna králíků kontrolní skupiny i v masě králíků s doplňkem Cu (Tab. 13). Přídavek vitaminu E tvorbu TBARS při skladování signifikantně snížil.

Tab. 13. Tvorba látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) v mase stehna králíků¹ kontrolní skupiny, skupiny s doplňkem síranu měďnatého a skupiny se síranem měďnatým a vitamínem E.

	Kontrola	CuSO ₄	CuSO ₄ + vitamín E
TBARS (mg MDA/kg)			
den 0	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,3
den 3	4,2 ± 0,4 ^a	4,2 ± 0,7 ^a	2,6 ± 0,1 ^b
den 6	7,7 ± 1,5 ^a	6,3 ± 0,9 ^a	4,2 ± 0,6 ^b

Průměrné hodnoty ± S.D.

¹ Vzorok z 6 králíků z každé skupiny.

MDA, malondialdehyd

^{ab} Hodnoty s odlišným indexem jsou významně odlišné (P < 0,05).

8.5. Diskuse výsledků pokusů s antioxidanty

Doplňek selenu či vitamínu E neměl vliv na příjem krmiva a růst telat a králíků. I u kontrolních skupin byl zřejmě příjem těchto esenciálních látek dostatečný. Selen se dobře ukládal do požitelných tkání a zvýšil tak jejich nutriční hodnotu. Denní potřebě Se u lidí (55 µg) odpovídá příjem 80 – 140 g masa telat a králíků v jejichž dietě byl obsah Se zvýšen na 0,50 mg/kg. Obsah vitamínu E v mase telat byl nízký a příliš se nezvýšil ani při jeho větším alimentárním příjmu. Důvodem zřejmě byla zvýšená spotřeba vitamínu E k likvidaci peroxylových radikálů (v mléčné náhražce byl obsažen lněný olej).

U telat zvýšený příjem selenu zvýšil aktivitu glutathion peroxidasy v játrech a v druhém z obou pokusů také v mase. V obou pokusech byla doplňkem Se nesignifikantně zvýšena oxidační stabilita masa. Vitamin E byl v tomto směru mnohem účinnější. U králíků doplňek Se aktivitu glutathion peroxidasy ani oxidační stabilitu masa neovlivnil. Vztah mezi aktivitou glutathion peroxidasy v mase a zásobením organismu králíků selenem nepozorovali ani Erdélyi a kol. (2000). Zde je však nutno poznamenat, že u králíků některé tkáně obsahují dostatečné množství glutathion peroxidasy nezávisle na selenu (Lee a kol., 1979). Králíci jsou k nedostatku Se v potravě necitliví. Výsledky posledního pokusu však ukazují, že oxidační stabilitu masa králíků lze výrazně zlepšit přidáním vitamínu E do krmné směsi.

9. Závěrečné poznámky

Problematika antioxidantů je široká a zasahuje do různých oblastí fyziologie. Ve výživě zvířat se význam antioxidantů zvýšil v důsledku častějšího používání olejnin, které sice zlepšují skladbu lipidů v živočišných produktech, současně ale zvětšují jejich náchylnost

k oxidačnímu poškození. Kapitola č. 8 ukazuje možnosti, ale současně i meze, které použití nejběžnějších antioxidantů (vitaminu E a selenu) přináší. Studie s vitaminem E a selenem patří k hlavnímu směru výzkumu použití antioxidantů ve výživě zvířat. Námětem pro další výzkum mohou být interakce mezi antioxidanty, např. mezi vitaminem E a C, dané tím, že působí v různých buněčných kompartmentech. Zajímavou možností by mohlo být obohacení živočišných produktů o antioxidanty se specifickou fyziologickou funkcí, např. o lutein a zeaxanthin. Zcela jistě bude pokračovat základní výzkum antioxidantů, např. jejich interakce s imunitním systémem, souvislost s oxidačním stresem a vývoj příslušných metodik.

10. Literatura

- Aebi, H.E.: Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3, Weinheim (Germany): Verlag Chemie str. 273-286, 1983.
- Anon.: *Vitamin E in Animal Nutrition*. F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel (Switzerland), 1973.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A.: Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 453-473, 2001.
- Bendich, A., Olson, J.A.: Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 3: 1927-1932, 1989.
- Benzie, I.F.F.: Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39: 53-61, 2000.
- Bergendi, L., Ferenčík, M.: Biologický význam superoxidového aniónového radikálu. *Bull. Čs. spol. bioch.* 16: 12-21, 1988.
- Blache, D., Gesquière, L., Loreau, N., Durand, P.: Oxidant stress: the role of nutrients in cell-lipoprotein interactions. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 559-563, 1999.
- Bobček, B., Lahučký, R., Mrázová, J., Bobček, R., Novotná, K., Vašíček, D.: Effects of dietary organic selenium supplementation on selenium content, antioxidative status of muscles and meat quality of pigs. *Czech J. Anim. Sci.* 49: 411-417, 2004.
- Boldižárová, K., Grešáková, L., Faix, Š., Levkut, M., Leng, L.: Urinary selenium excretion in selenite-loaded sheep and subsequent Se dynamics in blood constituents. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 385-393, 2003.
- Burton, G.W., Ingold, K.U.: β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569, 1984.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Bernardini, M.: Effect of dietary vitamin E supplementation on the characteristics of refrigerated and frozen rabbit meat. *Ital. J. Food Sci.* 11: 151-160, 1999.

- Castellini, C., Dal Bosco, A., Bernardini, M.: Improvement of lipid stability of rabbit meat by vitamin E and C administration. *J. Sci. Food Agric.* 81: 46-53 (online 2000).
- Ceriello, A.: Oxidative stress and glyceemic regulation. *Metabolism* 49 (Suppl. 1): 27-29, 2000.
- Corino, C., Mourot, J., Magni, S., Pastorelli, G., Rosi, F.: Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J. Anim. Sci.* 80: 1020-1028, 2002.
- Corino, C., Pastorelli, G., Pantaleo, L., Oriani, G., Salvatori, G.: Improvement of color and lipid stability of rabbit meat by dietary supplementation with vitamin E. *Meat Sci.* 52: 285-289, 1999.
- Cortinas, L., Baucells, M.D., Villaverde, C., Guardiola, F., Jensen, S.K., Barroeta, A.C.: Influence of dietary polyunsaturation level on alpha-tocopherol content in chicken meat. *Arch. Geflügel.* 70: 98-105, 2006.
- Dal Bosco, A., Castellini, C., Bernardini, M.: Dietary vitamin E, oxidative stability and fatty acid profile of homogenised and lyophilised rabbit meat. *Ital. J. Food Sci.* 11: 379-388, 1999.
- Daun, C., Åkesson, B.: Comparison of glutathione peroxidase activity, and of total and soluble selenium content in two muscles from chicken, turkey, duck, oistrich and lamb. *Food Chem.* 85: 295-303, 2004a.
- Daun, C., Åkesson, B.: Glutathione peroxidase activity, and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production. *Meat Sci.* 66: 801-807, 2004b.
- Daun, C., Johansson, M., Önning, G., Åkesson, B.: Glutathione peroxidase activity, tissue and soluble selenium content in beef and pork in relation to meat ageing and pig RN phenotype. *Food Chem.* 73: 313-319, 2001.
- DeVore, V.R., Greene, B.E.: Glutathione peroxidase in post-rigor bovine semitendinosus muscle. *J. Food Sci.* 47: 1406-1409, 1982.
- Diplock, A.T., Charleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J.: Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* 80 (Suppl. 1): S77-S112, 1998.
- Eder, K., Grünthal, G., Kluge, H., Hirche, F., Spilke, J., Brandsch, C.: Concentrations of cholesterol oxidation products in raw, heat-processed and frozen-stored meat of broiler

- chickens fed diets differing in the type of fat and vitamin E concentrations. *Br. J. Nutr.* 93: 633-643, 2005.
- Eichenberger, B., Pfirter, H.P., Wenk, C., Gebert, S.: Influence of dietary vitamin E and C supplementation on vitamin E and C content and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in different tissues of growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 58: 195-208, 2004.
- Eikelenboom, G., Hovingbolink, A.H., Kluitman, I., Houben, J.H., Klont, R.E.: Effect of dietary vitamin E supplementation on beef colour stability. *Meat Sci.* 54: 17-22, 1999.
- EN 12822: Determination of Vitamin E by High Performance Liquid Chromatography- Measurement of α -, β -, γ - and δ -tocopherols. European Standard. European Committee for Standardization. Brussels, 2000.
- Engeseth, N.J., Gray, J.I., Booren, A.M., Ashar, A.: Improved oxidative stability of veal lipids and cholesterol through dietary vitamin E supplementation. *Meat Sci.* 35: 1-15, 1993.
- Erdélyi, M., Virág, G., Mézes, M.: Effect of supranutritional additive selenium supply on the tissue selenium concentration and the activity of glutathione peroxidase enzyme in rabbit. *World Rabbit Sci.* 8 (Suppl. 1): 183-189, 2000.
- Fee, J.A.: Is superoxide important in oxygen poisoning? *TIBS*, březen 1982, str. 84-86.
- Gatellier, P., Mercier, Y., Renerre, M.: Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Sci.* 67: 385-394, 2004.
- Graf, E.: Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 435-448, 1992.
- Gunter, S.A., Beck, P.A., Phillips, J.M.: Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. *J. Anim. Sci.* 81: 856-864, 2003.
- Halliwell, B.: Oxygen-free-radicals in living systems: dangerous but useful? In: *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*, str. 195-221, Dahlem Konferenzen, Berlin 1979.
- Harrison, J.H., Conrad, H.R.: Effect of selenium intake on selenium utilization by the nonlactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* 67: 219-223, 1984.
- Hassan, H.M., Fridovich, I.: Superoxide dismutase and its role for survival in the presence of oxygen. In: *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*, str. 179-193, Dahlem Konferenzen, Berlin 1979.
- Hernández, P., Zomeno, L., Arino, B., Blasco, A.: Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Sci.* 66: 525-529, 2004.
- Hollman, P.C.H., Katan, M.B.: Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Rad. Res.* 31: S75-S80, 1999.

- Holovská, K., Jr., Holovská, K., Boldizárová, K., Čekonová, S., Lenártová, V., Levkut, M., Javorský, P., Leng, L.: Antioxidant enzyme activities in liver tissue of chickens fed diets supplemented with various forms and amounts of selenium. *J. Anim. Feed Sci.* 12: 143-152, 2003.
- Hromádková, Z.: Biologicky aktivne polysacharidy z liečivých bylín a iných rastlín. *Chem. Listy* 100: 843, 2006.
- Hughes, D.A.: Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 79-84, 1999.
- Kalous, M., Drahotka, Z.: The role of mitochondria in aging. *Physiol. Res.* 45: 351-359, 1996.
- Kim, B.-C., Ryu, Y.-C., Cho, Y.-J., Rhee, M.-S.: Influence of dietary α -tocopheryl acetate supplementation on cholesterol oxidation in retail packed chicken meat during refrigerated storage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 808-814, 2006.
- Kim, H.-K., Kim, S.-R., Ahn, J.-Y., Cho, I.-j., Yoon, C.-S., Ha, T.-Y.: Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 51: 8-15, 2005.
- Kirchheim, U., Löhnert, H.-J., Bargholz, J., Schneider, A., Schöne, F.: Bedarfsübersteigende Vitamin E-Gaben an Mastbullen, Kälber und Schweine-Beeinflussung der Fleisch- und Fettqualität. *Züchtungskunde* 72: 129-139, 2000.
- Kogan, G.: Antioxidačné, antimutagenné a antigenotoxické vlastnosti polysacharidov bunkových stien kvasiniek. *Chem. Listy* 100: 844-845, 2006.
- Korunová, V., Škodová, Z., Dědina, J., Valenta, Z., Pařízek, J., Píša, Z., Styblo, M.: Serum selenium in adult Czechoslovak (Central Bohemia) population. *Biol. Trace Elem. Res.* 37: 91-99, 1993.
- Krajčovičová-Kudláčková, M., Dušínská, M., Valachovičová, M., Blažíček, P., Pauková, V.: Products of DNA, protein and lipid oxidative damage in relation to vitamin C plasma concentration. *Physiol. Res.* 55: 227-231, 2006.
- Kursa, J., Kroupová, V.: Selenium content in cattle fur in incidence areas of nutritional muscle dystrophy. *Vet. Med. (Praha)* 20: 75-81, 1975.
- Lee, Y.H., Layman, D.K., Bell, R.R.: Selenium-dependent and non selenium-dependent glutathione peroxidase activity in rabbit tissue. *Nutr. Rep. Inter.* 20: 573-578, 1979.
- Leng, L., Bobcek, R., Kuricová, S., Boldizárová, K., Grešáková, L., Ševčíková, Z., Révajová, V., Levkutová, M., Levkut, M.: Comparative metabolic and immune responses of chickens fed diets containing inorganic selenium and Sel-PlexTM organic selenium. In:

- Proc. Alltech's 19th Ann. Symp. Nottingham University Press Nottingham, U.K., 131-145, 2003.
- Macek, T.: Superoxiddismutasa. Bull. Čs. spol. bioch. 8: 3-12, 1980.
- Molnár, J., Macpherson, A., Molnár, P.: The effects of selenium supplementation in feeding of lambs. Acta Alim. 27: 167-179, 1998.
- Morris, J.G.: The physiology of obligate anaerobiosis. In: Advances in Microbial Physiology, vol. 12. Academic Press, 1975.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: Harperova biochemie. Nakladatelství a vydavatelství H & H, Praha 1998.
- O'Grady, M.N., Monahan, F.J., Fallon, R.J., Allen, P.: Effects of dietary supplementation with vitamin E and organic selenium on the oxidative stability of beef. J. Anim. Sci. 79: 2827-2834, 2001.
- Pavlata, L., Illek, J., Pechová, A., Matějček, M.: Selenium status of cattle in the Czech Republic. Acta Vet. Brno 71: 3-8, 2002.
- Pavlata, L., Pechová, A., Illek, J.: Direct and indirect assessment of selenium status in cattle - a comparison. Acta Vet. Brno 69: 281-287, 2000.
- Payne, R.L., Southern, L.L.: Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers. Poult. Sci. 84: 898-902, 2005.
- Piette, G., Raymond, Y.: A comparative evaluation of methods to determine rancidity in processed meat. Fleischwirtschaft 7: 69-73, 1999.
- Powell, S.R.: The antioxidant properties of zinc. J. Nutr. 130: 1447S-1454S, 2000.
- Rayman, M.P.: The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? Br. J. Nutr. 92: 557-573, 2004.
- Ruprich, J., Řehůřková, I.: Dietární expozice selenu v České republice. Státní zdravotní ústav v Praze, Centrum hygieny potravních řetězců, Brno 2003, webová adresa - <http://www.chpr.szu.cz/chemtox/chem/selen/selen.htm>
- Sadrzadeh, S.M., Graf, E., Panter, S.S., Hallaway, P.E., Eaton, J.W.: Hemoglobin. A biologic Fenton reagent. J. Biol. Chem. 259: 14354-14356, 1984.
- Salvatori, G., Maiorano, G., Pantaleo, L., Brienza, A., Filetti, F., Manchisi, G.: Control of dietary energy level and dl-alpha-tocopheryl acetate treatment can improve the lipid composition of lamb meat. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 73: 171-179, 2003.
- Scalbert, A., Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr. 130: 2073S-2085S, 2000.

- Scholz, R.W., Todhunter, D.A., Cook, L.S.: Selenium content and glutathione peroxidase activity in tissues of young cattle fed supplemented whole milk diets. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1718-1723, 1981.
- Shah, N.P.: Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br. J. Nutr.* 84 (Suppl. 1): S3-S10, 2000.
- Skřivanová, V., Skřivan, M., Marounek, M., Baran, M.: Effect of feeding supplemental copper on performance, fatty acid profile and on cholesterol contents and oxidative stability of meat of rabbits. *Arch. Anim. Nutr.* 54: 329-339, 2001.
- Talas, Z.S., Yilmaz, I., Ozdemir, I., Gok, Y., Orun, I., Cetinkaya, B.: The defensive effects of synthetic organoselenium compounds on the antioxidative system of DMBA induced rat brain. *FEBS J.* 273 (Suppl. 1): 154-155, 2006.
- Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T., Dugan, Jr.L.: A distillation method for quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37: 44-48, 1960.
- Thurnham, D.I., Northrop-Clewes, C.A.: Optimal nutrition: vitamin A and the carotenoids. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 449-457, 1999.
- Virtamo, J.: Vitamins and lung cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 329-333, 1999.
- Walsh, D.M., Kennedy, D.G., Goodall, E.A., Kennedy, S.: Antioxidant enzyme activity in the muscles of calves depleted of vitamin E or selenium or both. *Br. J. Nutr.* 70: 621-630, 1993.