

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Jasminka Zucić

**PROMJENE SERUMSKE
KONCENTRACIJE ENZIMA
GLUTATION PEROKSIDAZE GP_x3 KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA
HRANJENIH HRANOM OBOGAĆENOM
SELENOM I CINKOM**

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Jasminka Zucić

**PROMJENE SERUMSKE
KONCENTRACIJE ENZIMA
GLUTATION PEROKSIDAZE GP_x3 KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA
HRANJENIH HRANOM OBOGAĆENOM
SELENOM I CINKOM**

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Odsjek za fiziologiju i imunologiju

Mentorica je rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med., predsjednica Katedre za fiziologiju i imunologiju

Neposredna je voditeljica: dr. sc. Anita Matić, dipl. ing.

Rad ima 24 lista, 1 tablicu i 1 sliku.

Ovaj završni rad ostvaren je na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije i Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju u sklopu znanstvenoga projekta „Utjecaj hrane obogaćene selenom i cinkom na vaskularnu reaktivnost krvnih žila kod Sprague-Dawley štakora“ voditeljice prof. dr. sc. Ines Drenjančević.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost u prvom redu dugujem mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević i dr. sc. Aniti Matić koje su mi svojim znanjem i potporom omogućile izradu ovog preddiplomskog rada. Hvala im na nesebičnim savjetima, strpljenju i vremenu za moje brojne upite.

Zahvaljujem i svojim roditeljima. Posebnu zahvalnost upućujem svojem supruhu Bruni i sinovima Luki i Anti koji su me nesebično podržavali na mojem putu.

KAZALO

1. UVOD	
1.1 Slobodni radikali	1
1.2 Antioksidansi	1
1.3 Uloga slobodnih radikala i oksidacijski stres	2
1.4 Glutation peroksidaze	3
1.5 Struktura GPX	4
1.6 Elementi u tragu	4
1.7 Esencijalni elementi u tragu	5
1.8 Hrana bogata selenom i cinkom	6
1.9 ELISA-Imunoenzimski test	6
2. HIPOTEZA	7
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
4. MATERIJALI I METODE	9
4.1 Metoda	9
4.2 Statističke metode	9
5. REZULTATI	10
5.1 Koncentracija GPx3 antioksidacijskog enzima u uzorcima seruma	10
6. RASPRAVA	11
7. ZAKLJUČAK	13
8. SAŽETAK	14
9. SUMMARY	15
10. LITERATURA	16

1. UVOD

1.1. Slobodni radikali

Slobodni su radikali kemijske vrste s nesparenim elektronom u vanjskoj orbitali. Vrlo su nestabilni i reaktivni. Da bi sparili svoj slobodni elektron, stupaju u organizmu u reakciji s biološkim molekulama (proteini, lipidi, ugljikohidrati, nukleinske kiseline). Pri tim reakcijama uzrokuju oštećenje bioloških molekula. Reakcije slobodnih radikala obično su lančane jer jedan radikal stvara drugi i pojačava oštećenje (1).

Najzastupljeniji su reaktivni kisikovi spojevi - ROS (Reactive Oxygen Species). Njima pripadaju superoksidni radikal, hidroksilni radikal, hiperperoksidni radikal, ali i neki neradikali (vodikov peroksid, singlet kisika ili hipoklorita). ROS u organizmu može nastati djelovanjem enzima koji tijekom enzimske reakcije katalizira redukciju kisika u superoksidni radikal ili vodikov peroksid. Također može nastati reakcijama autooksidacije ili prijenosom elektrona bez posredovanja enzima na respiracijskom lancu unutrašnje membrane mitohondrija ili aktiviranjem tijekom upute (2).

Hidroksilni je radikal najreaktivniji radikal u organizmu. Reagens je s bazama u DNA i uzrokuje oštećenje DNA što naravno može rezultirati mutagenozom i karcinogenozom. Ljudski je organizam aeroban i da bi se održavao život, neophodan je kontakt stanice s kisikom. Organizam je razvio nekoliko mehanizama obrane od štetnog djelovanja ROS-a i ostalih radikala. Dakle, antioksidans je svaki spoj koji sprječava oksidaciju (1).

1.2. Antioksidansi

Antioksidacijska je zaštita važna u uklanjanju slobodnih radikala jer osigurava maksimalnu zaštitu bioloških mjesta kao što su tiolne skupine koje su dio aktivnih mjesta u nekim metabolizirajućim enzimima (11,21). Dobar antioksidans specifično potiskuje slobodne radikale, kelira redoks-metale, međusobno djeluje s drugim antioksidansima unutar antioksidacijske mreže, ima povoljan učinak na izražaj gena, lako se apsorbira, ima fiziološki relevantnu koncentraciju u tkivima i biološkim tekućinama te djeluje i u vodenim i/ili membranskim domenama (11). Najdjelotvorniji enzimski antioksidansi obuhvaćaju superoksid-dismutazu, katalazu i glutation-peroksidazu. Neenzimski antioksidansi uključuju tiolne antioksidanse (glutation, tioredoksin i lipoičnu kiselinu), vitamin C, vitamin E, karotenoide, prirodne flavonoide te druge spojeve (selen) (22).

Tablica 1. Podjela antioksidansa (prema: Čepelak i sur. (2))

Izvanstanični	
Transferin Laktoferin	Vežu Fe^{3+}
Haptoglobin Hemopeksin	Vežu hemoglobin, odnosno hem
Ceruloplazin	Veže bakar i katalizira oksidaciju Fe^{2+}
Urati	Vežu organske i anorganske ROS
Membranski	
α -tokoferol	Štiti lipide u staničnoj membrani
β -karoten	Veže singlet kisik i hidroksilni radikal
Stanični	
Enzimi: Superoksid dismutaza, Sod, Zn, Cu SOD, Mn SOD Katalaza Glutation peroksidaza	Kataliziraju prevođenje superoksidnog radikala u vodikov peroksid. Katalizira prevođenje vodikovog peroksida u molekulu vode i kisika. Uz pomoć glutaciona, GSH, uklanja vodikov peroksid i lipidne perokside.
Askorbinska kiselina	Reverzibilni je oksidoredukcijski sustav – reducira α -tokoferolni radikal, perokside i ostale radikale.

1.3. Uloga slobodnih radikala i oksidacijski stres

Slobodni radikali esencijalni su za stvaranje energije u respiracijskom lancu na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Također su i neophodni u procesu nastanka hormona štitnjače i prostaglandina. Uz to imaju baktericidan učinak i sudjeluju u procesu fagocitoze (2).

Oksidacijski se stres definira kao poremećaj ravnoteže prooksidansa, primjerice slobodnih radikala ROS-a i antioksidansa u korist prooksidansa. Do pomaka ravnoteže može doći ako je smanjena antioksidacijska razina ili ako je stvaranje radikala pojačano (8).

U stanju pojačanog oksidacijskog stresa dolazi do porasta ROS-a u organizmu ili tkivu te dolazi do oštećenja DNA-a, proteina, lipida, stanične membrane. Oštećenje DNK uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji čiji su konačni produkti reaktivni aldehidi. U istraživanju učinka oksidacijskog stresa koriste se različiti *vivo* modeli (kulture animalnih stanica, kvasac, alge, primarne kulture i rad s laboratorijskim životinjama). Poznato je da je oksidacijski stres dio etiopatogenetskih mehanizma koji dovode do poremećaja vaskularne (endotelne funkcije) te pridonosi razvoju i napredovanju različitih kardiometaboličkih bolesti (hipertenzija, šećerna bolest, ateroskleroza, pretilost). Upravo bi prehrana obogaćena mikroelementima mogla dovesti do povećanja koncentracije antioksidacijskih enzima, a time i do bolje zaštite od oksidacijskog stresa (23).

1.4. Glutation peroksidaze

Glutation peroksidaza (GPx) skupina je osam (GPx1-8) enzima koji su važni za prevođenje i smanjenje razine H_2O_2 . GPx su selenocistein enzimi koji koriste glutation kao redukcijsko sredstvo (4). U mozgu se selenoproteini GPx1-3, GPx1 i 4 nalaze u mitohondrijima, jezgri i citoplazmi. Glutation peroksidaza smanjuje razinu vodikova peroksida samostalnim djelovanjem, ali učinkovitije smanjuju toksičnost egzogenog vodikova peroksida zajedničkim djelovanjem (3).

Poznato je osam izoformi GPx-a koje su supstratno specifične, a razlikuju se po staničnoj lokalizaciji i genu koji ih kodira. Četiri su izoforme ovisne o selenu (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4), a ostale su četiri neovisne o selenu (GPx5, GPx6, GPx7, GPx8) (4). Kako se GPx izoforme razlikuju po lokalizaciji u stanici, imaju i različitu antioksidacijsku ulogu. GPx1, GPx2, i GPx3 jesu homotetrameri, dok je GPx4 monomer koji je manje molekulske veličine od podjedinica ostalih peroksidaza. Upravo zahvaljujući maloj veličini, ali i hidrofobnoj površini, GPx4 ima sposobnost reagirati s membranskim lipidima (4). Ono što čini bitnu fiziološku razliku između dviju skupina peroksidaza jest to što peroksidaze ovisne o selenu mogu reducirati i organske i neorganske supstrate, a one neovisne o selenu samo organske. Važno je također naglasiti da je GPx1 najzastupljenija izoforma peroksidaza koja se nalazi u citosolu i mitohondrijima, a velike su količine pronađene u organima kao što je jetra, gdje je velika proizvodnja peroksida (4).

1.5. Struktura GPX

Premda su GPX1, GPX3 i GI-GPX2 homotetrameri, GPX4 je monomer s molekularnom veličinom manjom od podjedinica drugih glutation-peroksidaza. Zbog svoje male veličine i vodoodbojne površine, GPX4 imaju sposobnost reagiranja sa složenim membranskim lipidima (27).

Struktura GPX u sisavaca također je analizirana računalom uz pomoć molekularnog modeliranja. Dobiveni modeli upućuju na to da su osnovne faze katalize tri zasebne redoks-promjene selen na aktivnom mjestu koji se u osnovnom stanju pojavljuje na površini selenoperoxidaza kao središte karakteristične trijade koju izgrađuju selenocistein, glutamin i triptofan. U GPX četiri argininska ostatka i lizinski ostatak osiguravaju elektrostatičan ustroj koji u svakom reduktivnom koraku usmjerava glutation donorski supstrat (engl. donor substrate glutathione, GSH) prema katalitičkom središtu tako da njegova sulfhidrilna skupina mora reagirati s dijelom molekule selen. Štoviše, mehanizmi vezanja kosupstrata jedinstveni su za klasičnu vrstu GPX1, no ne djeluju kod GPX3 i GPX4 (26).

Analizom selenoproteoma karakterizirane su funkcije i slijed šest glutation-peroksidaza (GPX) u sisavaca: citosolne (cGPX, GPX1), prvog identificiranog selenoproteina kod sisavaca (6,15), fosfolipid-hidroperoksidne GPX (PHGPX, GPX4), koja je prvi put opisana 1982. godine i kasnije sekvenciranjem potvrđena kao selenoprotein (28), te druge sekvencirane plazmatske GPX (pGPX, GPX3) (23), gastrointestinalne GPX (GI-GPX, GPX2) (24) te kod ljudi GPX6 koja je ograničena na olfaktorni sustav (27).

1.6. Elementi u tragu

Elementi u tragu vrlo su važni za žive organizme jer su potrebni za normalnu funkciju organizma, za rast i obavljanje mnogih metaboličkih funkcija. Kao element u tragu definira se onaj element koji ima manje od 0.01 % ukupne tjelesne mase. Svi elementi u tragu zajedno čine manje od 0.01 % tjelesne mase (2). Esencijalni su oni koji su potrebni za život i normalnu funkciju organizma. Količine u ljudskom tijelu kreću se od 1.5 mg do 4.5 g. Neesencijalni nisu potrebni za život, a u većim su količinama toksični za čovjeka. Za elemente u tragu karakteristično je da se njihovo djelovanje umnožava, tj. vrlo male količine nekog elementa u tragu utječu na stanje cijelog organizma. Vrlo su specifični, imaju svoju homeostatičku regulaciju i ulaze u međusobne interakcije (2).

1.7. Esencijalni elementi u tragu

Danas se smatra da je 13 elemenata nužno za normalno čovjekovo djelovanje: željezo, bakar, cink, krom, mangan, fluor, jod, stroncij, molibden, kobalt, selen, nikal, i vanadij (1).

Selen je sastavni dio glutathion – peroksidaze enzima koji katalizira razgradnju peroksida stvorenih tijekom oksidacijskog metabolizma u stanicama te tako štiti organizam od nakupljanja lipidnih peroksida i slobodnih radikala koji oštećuju stanične membrane. Dnevna potreba za selenom iznosi oko 55 mikrograma za žene te 70 mikrograma za muškarce, a u hrani ovisi o količini proteina i sadržaju selena u tlu (25). U krvi se nalazi više selena u eritrocitima nego u plazmi u kojoj je vezan za SH-skupine proteina. Iz tijela se luči urinom kao trimetilselenijev ion, a u plućima u obliku dimetil-selenida. Manjak selena susreće se u Kini i s tim je u vezi Keshanova bolest, posebna vrsta kardiomiopatije koja pogađa žene u reproduktivnoj dobi i djecu. Inače, manjak selena može biti i kod osoba na parenteralnoj terapiji te osoba s karcinomom GI trakta, trudnica, a velik manjak u osoba s retikuloendotelnim novotvorbama. Uz selen se određuje i glutathion-peroksidaza. Velika aktivnost tog enzima nalazi se u leukocitima i makrofagima, štite te stanice od djelovanja peroksida koji se stvaraju tijekom oksidacijske razgradnje stranih tvari u njima (25). Smanjenu aktivnost glutathion-peroksidaze u krvi susrećemo kod hemolitičke anemije, poremećaja trombocita s krvarenjem i karcinoma (1). Cink se unosi u tijelo hranom, vodom, čak i zrakom. Normalnom se prehranom dnevno unosi 10 - 15 mg cinka. Cink sadržavaju žitarice i brašno, šećer, meso, riba (1). No postoji problem jer mnoge su namirnice zbog pročišćavanja siromašne cinkom. Glavni su izvor cinka crni ili raženi kruh, meso ili orasi. Cink je potreban za rast, keratinizaciju kože i sintezu proteina. U tijelu je vezan za proteine. Poznato je više od 300 enzima za čiju je aktivnost potreban cink. Osim toga, više od 500 proteina uključenih u regulaciju transkripcije i replikacije sadrži cinkove ione (24). Već sama činjenica da je potreban za aktivnost tolikih enzima upućuje na njegovu važnost za metabolizam i održavanje normalne funkcije organizma. Primijećeno je da je manjak cinka prisutan pri raznim patološkim stanjima (1) poput alergija, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i lošeg imuniteta. U tijelu zdrave osobe ima oko 1,3 - 2,3 g cinka, najzastupljeniji je element u tragu, nalazi se u stanicama gotovo svih organa u obliku kompleksa s proteinima. U krvnoj se plazmi cink uglavnom prenosi vezan za albumin i alfa 2-makroglobulin. Iz organizma se izlučuje stolicom, a manje urinom. Koncentracija cinka u serumu mijenja pri mnogim bolestima. Povećana koncentracija dosta je rijetka, a mnogo je češći manjak cinka zbog neodgovarajuće prehrane. Zbog manjka cinka pojavljuje se zastoje u rastu, u

sazrijevanju skeleta, atrofija testisa, hepatosplenomegalija, podložnost infekcijama, ulceracije i sl. Smanjenje cinka uzrokuje i poremećaje gastro sustava te je uočena niska koncentracija i kod ateroskleroze i raznih karcinoma. Organizam šteti cink i u slučaju manjka smanjuje se izlučivanje (24).

1.8. Hrana bogata selenom i cinkom

Značajan su izvor cinka mlijeko i mliječni proizvodi, jaja, cjelovite žitarice. Crveno meso, posebno govedina i janjetina, i jetra imaju najveći sadržaj cinka. Cink iz namirnica životinjskog podrijetla bolje se apsorbira u želudcu, no ne smiju se zaboraviti ni biljni izvori cinka kao što su orašasti plodovi, grašak, soja, pivski kvasac, tofu, sjemenke. Selen se može naći u plodovima mora, posebno u plavoj ribi, te u gljivama, brokuli, češnjaku, rajčici i propolisu. Dobri su izvori selena i proizvodi od cijelog zrna te suncokretovo sjeme. Količina selena u hrani varira i ovisna je o tlu gdje su namirnice uzgajane. Obradivanjem namirnica selen se uništava te je najbolje unositi ga u organizam putem neprerađene hrane (2).

1.9. ELISA - imunoenzimski test

ELISA je imunoenzimski test visoke osjetljivosti i selektivnosti za određivanje prisutnosti i količine specifičnih molekula (analita) (28). Temelji se na reakciji antigena na antitijelo. Tom tehnikom moguće je određivanje vrlo niskih koncentracija analita (do ng/kg), često uz relativno jednostavnu pripremu uzorka i istovremeno ispitivanje velikog broja uzoraka tijekom samo jednog pokusa. ELISA se provodi na standardnim mikrotitarskim pločama s velikim brojem jažica. Postoji mnogo varijacija ELISA tehnike, a tri su osnovna tipa: direktni, indirektni i tzv. "sendvič" test, a sva tri se mogu temeljiti na kompetitivnoj ili inhibicijskoj tehnici. Kod kompetitivne tehnike antitijela specifična za analit imobilizirana su u jažicama. Za vezna mjesta na antitijelima natječu se analit iz uzorka i enzimom obilježeni analit-kompetitor. Ispiranjem se uklanja višak analita obilježenog enzimom te se dodaje bezbojni supstrat koji pod djelovanjem enzima mijenja boju. Boja se mjeri spektrofotometrijski, a intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji analita u početnom uzorku (28).

2. HIPOTEZA

Koncentracija antioksidansa GPx3 značajno je povećana u hrani koja u svojem sastavu sadrži velike koncentracije selena.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je provedenoga istraživanja utvrditi razinu antioksidansa GPx3 u uzorcima hrane koji sadrže različite udjele selena i cinka u svojem sastavu.

4. MATERIJALI I METODE

Tri tjedna stari Sprague-Dawley štakori u razdoblju od osam tjedana konzumirali su hranu koja sadrži različite omjere selena i cinka (hrana Divana) u svojem sastavu:

- 1) niski selen, niski cink (28,56 mg/kg Zn i 0,030 mg/kg Se);
- 2) visoki selen, normalni cink (30,16 mg/kg Zn i 0,363 mg/kg Se)
- 3) normalni selen, visoki cink (70,81 mg/kg Zn i 0,043 mg/kg Se).

Nakon osam tjedana hranjenja štakori su anestetizirani kombinacijom Ketanest S 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Nakon anestezije, životinje su dekapitirane te su prikupljeni uzorci krvi u svrhu dobivanja seruma. Uzorci su krvi centrifugirani na 3500 okretaja kroz 10 minuta te je odvojen serum i pohranjen u hladnjak na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja eksperimenta.

Svi su eksperimentalni postupci bili usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Također, poduzete su sve mjere da bi se spriječila patnja životinja. Istraživanja je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/14-08/06, urbroj: 2158-61-07-14-05) te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (klasa: UP/I-322-01/14-01/90, urbroj: 525-10/0255-15-4).

4.1. Metoda

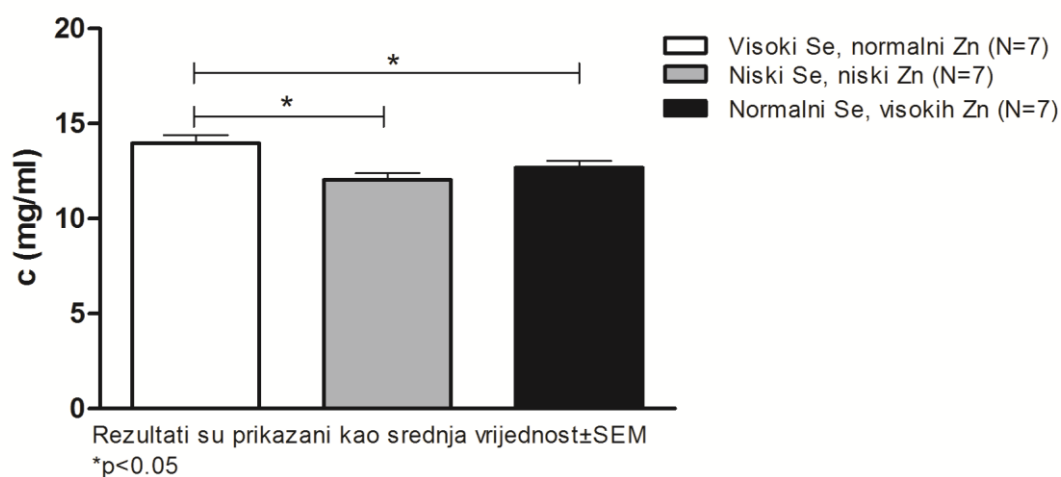
U ovom istraživanju koristila se spektrofotometrijska metoda (ELISA) u svrhu određivanja koncentracije GPx3 antioksidacijskog enzima u uzorcima seruma. Određivanje se provodilo pomoću komercijalno dostupnog ELISA kita (LSBio Kat. br. LS-F6289).

4.2. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM (SEM - standardna pogreška mjerenja). Za statističku analizu usporedbe skupina koristila se jednosmjerna analiza varijance - One-way ANOVA test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisov test. Razina statističke značajnosti iznosi $P < 0,05$. Koristio se statistički program SigmaPlot, inačica 11.2, Systat Software, Inc., Chicago, USA. Pomoću Sigma Plot v11.0 programa izračunata je veličina uzorka te ona za snagu testa od 0,8, $P < 0,05$ i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 što iznosi četiri uzorka (životinje) po skupini.

5. REZULTATI

5.1. Koncentracija GPx3 antioksidacijskoga enzima u uzorcima seruma



Slika 1. Koncentracija (ng/ml) antioksidacijskog enzima GPx3 u uzorcima seruma

Skupina životinja koja je konzumirala hranu s visokim udjelom selena i normalnim vrijednostima cinka (30,16 mg/kg Zn i 0,363 mg/kg Se) ima značajno povećanu koncentraciju GPx3 enzima (13.96 ± 0.42) u odnosu na skupinu s niskim sadržajem selena i niskim sadržajem cinka (28,56 mg/kg Zn i 0,030 mg/kg Se, 12.04 ± 0.33 , $p=0.002$) te hranom s normalnim sadržajem selena i visokim sadržajem cinka (70,81 mg/kg Zn i 0,043 mg/kg Se, 12.66 ± 0.66 , $P = 0.026$).

6. RASPRAVA

Selen (Se) i cink (Zn) esencijalni su mikroelementi, a kako bi se održala homeostaza organizma, potrebno ih je unositi u dovoljnoj količini hranom. Važni su za normalno održavanje oksidacijskog sustava jer sastavnim su dijelovima antioksidacijskih enzima kao što su glutathion-peroksidaza i superoksid dismutaza. U mnogim zemljama javlja se malnutricija tih mikronutrijenata. Nedovoljna količina unosa selena dovodi do nekrotizirajuće kardiomiopatije, periferne miopatije, smanjenog tonusa mišića i poremećaja koncentracije, stanjivanja kose i pucanja noktiju (5-7). Antioksidacijski enzimi neutraliziraju slobodne radikale i oksidacijske štetne međuproizvode metabolizma. Najznačajniji su antioksidacijski enzimi katalaza, glutathion peroksidaza, glutathion reductaza i superoksid dismutaza, a njima su potrebni kofaktori za njihovu katalitičku aktivnost. Kofaktori su tih enzima selen, cink, bakar, željezo i magnezij.

Glutathion peroksidaza obitelj je enzima koja metabolizira vodikov peroksid i lipidne hidroperokside na vodu. Postoji nekoliko različitih glutathion peroksidaza koje se nalaze u različitim tkivima. GPx1, GPx2, GPx3 i GPx4 imaju vezno mjesto za selen koji u reakcijama s vodikovim peroksidom oksidira (8-10).

Glutathion-peroksidaza uključena je u zaštitu od oksidacijskog stresa, pri čemu glutathion koristi kao supstrat. Glutathion također djeluje kao supstrat u drugim detoksificirajućim enzimima protiv oksidacijskog stresa kao što su glutathion-transferaze. On sudjeluje u prijenosu aminokiselina kroz plazmatsku membranu i izravno čisti hidroksilni radikal i singletni kisik te time detoksificira vodikov peroksid i lipidne perokside katalitičkim djelovanjem GPx. Glutathion može obnoviti najvažnije vitamine, tj. vitamine C i E, u njihove aktivne oblike (11).

Selen, kao dio aktivnog mjesta u GPx, osnovni je mikronutrijent za koji se pokazalo da smanjuje pojavnost različitih oboljenja (12-14). U humanim studijama pokazano je da su koncentracije selena obrnuto povezane sa smrtnošću i pojavnošću karcinoma (15-16).

Selen funkcionira kao antimutageni agens koji sprječava zloćudnu preinaku normalnih stanica. Čini se da su ti njegovi zaštitni učinci ponajprije povezani s aktivnošću glutathion-peroksidaza.

Glutathion peroksidaza 3 (GPx3) jedini je enzim iz skupine glutathion peroksidaza koji se luči u međustaničnom prostoru. Supstrat su tomu enzimu vodikov peroksid te fosfolipidni hidroperoksidi, a ima značajnu ulogu u antioksidacijskim procesima u krvnoj plazmi (17). Kako aktivnost tog enzima opada i do 99 % u slučaju deficita selena, GPx3 se široko koristi u procjeni statusa selena. Također, budući da se povećana aktivnost javlja kod nekih podtipova tumora jajnika (18), može se koristiti kao biomarker.

Prema uputama Svjetske zdravstvene organizacije, hrana koja sadrži 0.1 mg Se/kg smatra se zadovoljavajućim izvorom selena (19). Ovo je istraživanje pokazalo kako je ipak potrebna nešto viša koncentracija selena potrebna da bi se značajno povećala razina GPx3 te njegov antioksidacijski učinak (Slika 1.). Stupin i suradnici utvrdili su kako hrana obogaćena selenom ima zaštitnu ulogu u kardiovaskularnom sustavu na modelu makrocirkulacije (20).

I u ovom istraživanju pokazano je kako hrana koja sadrži veću koncentraciju selena u svojem sastavu ima višu koncentraciju GPx3 antioksidacijskog enzima što upućuje na pozitivan utjecaj selena na sniženje oksidacijskog stresa i zaštitu organizma od djelovanja slobodnih radikala (Slika 1.).

7. ZAKLJUČAK

- 1.) Koncentracija antioksidacijskog enzima GPx3 ovisna je o udjelu selena u hrani.
- 2.) Hrana koja sadrži visok udio selena pokazala se kao najbogatija antioksidansom GPx3 koji prema brojnim istraživanjima ima zaštitnu ulogu u organizmu.
- 3.) Hrana koja prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji sadrži dovoljne količine selena nije se pokazala značajno bogatijom antioksidansom GPx3 u odnosu na hranu s niskim udjelom selena.

8. SAŽETAK

CILJ: Utvrditi koncentraciju antioksidacijskog enzima GPx3 u uzorcima hrane koji sadrže različite udjele selena i cinka u svojem sastavu.

MATERIJALI I METODE: Tri tjedna stari Sprague-Dawley štakori u razdoblju od osam tjedana konzumirali su hranu koja sadrži različite omjere selena i cinka (hrana Divana) u svojem sastavu. Životinje su bile podijeljene u skupine: 1) niski selen, niski cink (28,56 mg/kg Zn i 0,030 mg/kg Se); 2) visoki selen, normalni cink (30,16 mg/kg Zn i 0,363 mg/kg Se) te 3) normalni selen, visoki cink (70,81 mg/kg Zn i 0,043 mg/kg Se).

Nakon osam tjedana hranjenja štakori su anestetizirani kombinacijom ketanest S 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Nakon anestezije, životinje su dekapitirane te su prikupljeni uzorci krvi u svrhu dobivanja seruma. Iz uzoraka seruma spektrofotometrijskom metodom (ELISA) odredila se koncentracija enzima glutation peroksidaze 3 (Gpx3). Svi su eksperimentalni postupci bili usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/ 609). Istraživanja je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.

REZULTATI: Hrana s visokim udjelom selena i normalnim vrijednostima cinka (30,16 mg/kg Zn i 0,363 mg/kg Se) ima značajno povećanu koncentraciju GPx3 enzima (13.96 ± 0.42 mg/ml) u odnosu na skupinu s niskim sadržajem selena i niskim sadržajem cinka (28,56 mg/kg Zn i 0,030 mg/kg Se, 12.04 ± 0.33 , $P = 0.002$) te hranom s normalnim sadržajem selena i visokim sadržajem cinka (70,81 mg/kg Zn i 0,043 mg/kg Se, 12.66 ± 0.66 , $P = 0.026$).

ZAKLJUČAK: Koncentracija antioksidacijskog enzima GPx3 ovisna je o udjelu selena u hrani. Hrana koja sadrži visok udio selena pokazala se kao najbogatija antioksidansom GPx3 koji prema brojnim istraživanjima ima zaštitnu ulogu u organizmu u odnosu na prehranu siromašnu selenom.

9. SUMMARY

AIM: Determine the concentration of the antioxidative enzyme GPx3 in food which contain different concentrations of selenium and zinc in its composition.

MATERIALS AND METHODS: Three weeks old Sprague-Dawley rats consumed foods containing different ratios of selenium and zinc (food Divan) in its composition over a period of 8 weeks. The animals were divided into: 1) low selenium, low zinc (28.56 mg / kg Zn and 0.030 mg / kg Se); 2) high selenium, normal zinc (30.16 mg / kg Zn and 0.363 mg / kg Se), and 3) normal selenium, high zinc (70.81 mg / kg Zn and 0.043 mg / kg Se).

After 8 weeks of feeding rats were anesthetized by ketanest S 75 mg / kg (Ketanest S 25 mg / ml, 2 ml ampoules, Pfizer) and midazolam 0.5 mg / kg (Midazolam Torrex 5 mg / ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) . After anesthesia, the animals were decapitated and blood samples were collected to obtain serum. Serum samples were determined by the spectrophotometric method (ELISA) for concentrations of glutathione peroxidase 3 (Gpx3). All experimental procedures were harmonized with European guidelines for the care and use of laboratory animals (Directive 86/609). The research was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine in Osijek and the Ministry of Agriculture of the Republic of Croatia.

RESULTS: Foods with a high selenium content and normal zinc levels (30.16 mg / kg Zn and 0.363 mg / kg Se) have significantly increased GPx3 enzyme concentrations (13.96 ± 0.42 mg / ml) compared to low selective selenium and low zinc (70.81 mg / kg Zn and 0.043 mg / kg Se, 12.66 ± 0.03 mg / kg Se, 12.04 ± 0.33 , $P = 0.002$) and foods with normal selenium content and high zinc content 0.66, $P = 0.026$).

CONCLUSION: The concentration of antioxidant enzyme GPx3 is dependent on the proportion of selenium in food. Foods containing a high proportion of selenium have been shown to be the richest with antioxidant GPx3 which, according to numerous studies, has a protective role in the body in relation to food poor with selenium.

10. LITERATURA

- 1) Topić Elizabeta: Medicinsko biokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi, Medicinska naklada Zagreb, 2004.
- 2) D.Čvorišćec i I.Čepelak Molekularna dijagnostika;Štrausova Medicinska biokemija.Medicinska naklada Zagreb, 2009.
- 3) Valko M., Rhodes CJ, Moncol J. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1): 1-40.
- 4) Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161-208.
- 5) Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez De Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595–603.
- 6) Harissa Gl. Oxidative Stress and Paraoxonase Activity in Experimental Selenosis: Effects of Betaine Administration, 2012.
- 7) Arthur C.,Guyton John E.Hall. Medicinska fiziologija 12 izdanje; Medicinska naklada d.o.o 2012, Zagreb
- 8) Brigelius – Flohé R, et al. *Biochim Biophys Acta*. 2013.
- 9) Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. *Am J Physiol. Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(1):H40-5
- 10) Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 2006;387(10-11):1329-35.
- 11) Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 2002;22:3565-76.
- 12) Brigelius-Flohé, R.; Banning, A.; Schnurr, K. Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxid. Redox Signal*. 2003, 5, 205–215.
- 13) Ghadirian P, Maisonneuve P, Perret C, Kennedy G, Boyle P, Krewski D, et al. A case-control study of toenail selenium and cancer of the breast, colon, and prostate. *Cancer Detect Prev* 2000;24(4):305-13.
- 14) Cooper, Geoffrey M; Hausman, Robert E. Stanica: Molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb 2010

- 15) Black RE. Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. *J Nutr* 2003; 133: 1485S-9S
- 16) Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001; 4:593-9
- 17) Davis CD, Uthus EO. Dietary folate and selenium affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation, global DNA methylation and one carbon metabolism rats. *J Nutr* 2003;133(9):2907-14.
- 18) Schwarz, K.; Foltz, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 3292–3293.
- 19) Hambidge, K. M. & Krebs, N. F. (2007). "Zinc deficiency: a special challenge". *J. Nutr.* 137 (4): 1101–5. PMID 17374687
- 20) Kamer B, Wąsowicz W, Pyziak K, Kamer-Bartosńska A, Gromadzińska J, Pasowska R. Role of selenium and zinc in the pathogenesis of food allergy in infants and young children. 2012
- 21) Güney M. Selenium-vitamin E combination modulates endometrial lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. 2012
- 22) Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, et al. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted GPX1 and GPX2 genes. *Cancer Res* 2004;64(3):962-8.
- 23) Brigelius-Flohe R, 1999, Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic Biol Med* 27, 951–965.
- 24) Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ, 2001, Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer, *Cancer Res*, 61, 3869–3876.
- 25) World Health Organization (WHO). Trace Elements in Human Nutrition and Health; Selenium; WHO: Geneva, Switzerland, 1996; pp. 105–122.
- 26) Stupin, Ana; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Vesel, Monika; Jukić, Ivana; Popović, Brigita; Karalić, Krunoslav; Lončarić, Zdenko; Drenjančević, Ines. Reduced dietary selenium impairs vascular function by increasing oxidative stress in Sprague-Dawley rat aortas. // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14 (2017) , 6; 591-591

- 27) McIntosh GH, Royle PJ, Scherer BL. Selenised dairy protein and colon cancer inhibition in AOM induced rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2004;13:S93.
- 28) Davis CD, Zeng H, Finley JW. Selenium-enriched broccoli decreases intestinal tumourigenesis in multiple intestinal neoplasia mice. *J Nutr* 2002;132(2):307-9.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Jasminka Zucić (rođ. Lukić)

Datum rođenja: 30. rujna 1969.

Adresa: Eugena Kumičića 2, 31 221 Josipovac, Republika Hrvatska

Obrazovanje:

- rujna 1984. – lipanj 1988.: Srednja škola „Ruđer Bošković“, Osijek
- rujna 2014. – rujna 2017.: preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku