

Utjecaj različitih oblika selena na biomarkere oksidacijskog stresa u gujavici *Eisenia andrei*

Petek, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:296208>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Anja Petek

**UTJECAJ RAZLIČITIH OBLIKA SELENA NA
BIOMARKERE OKSIDACIJSKOG STRESA U
GUJAVICI *Eisenia andrei***

Diplomski rad

OSIJEK, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ RAZLIČITIH OBLIKA SELENA NA BIOMARKERE OKSIDACIJSKOG STRESA U GUJAVICI *Eisenia andrei*

Anja Petek

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Osijek

Mentor: Dr.sc. Mirna Velki, docent

Komentor: Dr.sc. Rosemary Vuković, docent

Selen je element u tragovima s dva suprotna djelovanja - može djelovati kao esencijalan nutrijent za ljude, životinje i neke biljke ili pri visokim koncentracijama imati toksično djelovanje na organizme u okolišu. Granica između ta dva djelovanja selen je uska i ovisi o kemijskim oblicima selen, koncentraciji i ostalim okolišnim varijablama. Iako se selen smatra potencijalno toksičnim elementom, djelovanje selen na organizme u tlu slabo je istraženo. Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak različitih koncentracija dva oblika selen, selenita i selenata, na mortalitet i oksidacijski status gujavice *Eisenia andrei*. Kao indikator oksidacijskog stresa mjerena je razina lipidne peroksidacije, omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) te aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) i superoksid-dismutaze (SOD). Rezultati pokazuju da je selenit toksičniji od selenata te da izlaganje selenitu i selenatu uzrokuje promjene u oksidacijskom statusu gujavica.

Broj stranica: 53

Broj slika: 15

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 102

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: selenat, selenit, oksidacijski stres, lipidna peroksidacija, antioksidacijski enzimi, glutation, *Eisenia andrei*

Datum obrane: 12.12.2017.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Doc. dr. sc. Sandra Ečimović**, predsjednik povjerenstva;
2. **Doc. dr. sc. Mirna Velki**, mentor i član;
3. **Doc. dr. sc. Rosemary Vuković**, komentor i član
4. **Doc. dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac**, zamjenik člana

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

MS thesis

Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

EFFECTS OF DIFFERENT FORMS OF SELENIUM ON BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN EARTHWORM *Eisenia andrei*

Anja Petek

Thesis performed at Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek

Supervisor: Mirna Velki, PhD, Assistant Professor

Cosupervisor: Rosemary Vuković, PhD, Assistant Professor

Selenium is a trace element with dual effect – it is an essential element for humans, animals, and certain lower plants, but at higher concentration selenium becomes toxic to organisms. The boundary between beneficial and toxic effects is narrow and depends on its chemical form, applied concentration and other environmentally regulating factors. Even though selenium is potentially toxic, the effects of selenium on soil animals are poorly investigated. The aim of this study was to assess the impact of different concentrations of two selenium forms, selenate and selenite, on mortality and oxidative status in earthworm *Eisenia andrei*. As biomarkers of oxidative stress in earthworms, lipid peroxidation level, GSH/GSSG ratio and activities of enzymes glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) were measured. Results showed that selenite is more toxic than selenate and that exposure of earthworms to selenium causes changes in oxidative status of earthworms.

Number of pages: 53

Number of figures: 15

Number of tables: 3

Number of references: 102

Original in: Croatian

Keywords: selenate, selenite, oxidative stress, lipid peroxidation, antioxidative enzymes, glutathion, *Eisenia andrei*

Date of the thesis defence: 12th December 2017

Reviewers:

1. **Sandra Ečimović**, PhD, Assistant Professor, commission president
2. **Mirna Velki**, PhD, Assistant Professor, supervisor and member
3. **Rosemary Vuković**, PhD, Assistant Professor, cosupervisor and member
4. **Ivna Štolfa Čamagajevac**, PhD, Assistant Professor, substitute

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirni Velki na prenesenom znanju, savjetima, strpljenju i vremenu kojeg mi je poklonila tijekom izrade i pisanja ovog diplmskog rada.

Također, zahvaljujem se komentorici, doc. dr. sc. Rosemary Vuković na motivaciji, nesebičnoj pomoći i stručnom vodstvu kod izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su uljepšali moje akademsko obrazovanje smijehom, razumijevanjem i trenucima za pamćenje.

Hvala Maji i Magdalenii na iskrenom prijateljstvu, podršci i ljubavi za koju sam sigurna da će se nastaviti.

Hvala Luki, što je uvijek bio tu za mene.

Posebno hvala mojim roditeljima, bratu, baki i djedu, mojim najvećim motivatorima, koji su uvijek vjerovali u mene.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Selen	1
1.1.1. Selen u biljkama	2
1.1.1.1. Pregled istraživanja djelovanja selen na različite biljne vrste.....	3
1.1.2. Selen u animalnim organizmima	4
1.2. Gujavice.....	6
1.2.1. Biologija i ekologija gujavica.....	6
1.2.2. Važnost gujavica za funkcioniranje ekosustava tla	8
1.2.3. Gujavice kao modelni organizam u ekotoksikološkim istraživanjima.....	9
1.2.4. Istraživanja utjecaja selen na gujavice.....	10
1.3. Oksidacijski stres.....	11
1.3.1. Biomarkeri oksidacijskog stresa.....	13
1.3.1.1. Antioksidacijski enzimi kao biomarkeri oksidacijskog stresa	13
1.3.1.2. Glutation – neenzimski biomarker oksidacijskog stresa.....	14
1.3.1.3. Lipidna peroksidacija kao biomarker oksidacijskog stresa	15
1.4. Ciljevi istraživanja.....	16
2. MATERIJALI I METODE.....	17
2.1. Eksperimentalni organizam	17
2.1.1. Sistematika i biologija eksperimentalnog organizma - gujavice (<i>Eisenia andrei</i>)	17
2.1.2. Održavanje gujavica u laboratoriju i priprema za eksperiment.....	17
2.2. Određivanje mortaliteta gujavica pomoću kontaktnog filter papir testa	18
2.3. Izlaganje gujavica u svrhu određivanja oksidacijskog statusa	19
2.4. Mjerenje biomarkera oksidacijskog stresa	20
2.4.1. Priprema uzorka za mjerenje produkata lipidne peroksidacije	21
2.4.2. Određivanje lipidne peroksidacije.....	21
2.4.3. Priprema uzorka za mjerenje ukupnog, oksidiranog i reduciranog glutaciona.....	22
2.4.4. Određivanje ukupnog, oksidiranog i reduciranog glutaciona	22
2.4.5. Priprema uzoraka za mjerenje glutacion-reduktaze i superoksid-dismutaze te određivanje koncentracije proteina.....	23
2.4.6. Određivanje aktivnosti enzima glutacion-reduktaze.....	23
2.4.7. Određivanje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze.....	24

2.4.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina	25
2.4.9. Statistička obrada podataka	25
3. REZULTATI	26
3.1. Određivanje mortaliteta gujavici <i>Eisenia andrei</i> tretiranih selenitom i selenatom.....	26
3.2. Utjecaj različitih koncentracija selenata na razinu lipidne peroksidacije u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	28
3.3. Utjecaj različitih koncentracija selenita na razinu lipidne peroksidacije u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	29
3.4. Utjecaj različitih koncentracija selenata na omjer reduciranog i oksidiranog glutationa u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	30
3.5. Utjecaj različitih koncentracija selenita na omjer reduciranog i oksidiranog glutationa u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	31
3.6. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost glutation-reduktaze u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	32
3.7. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost glutation-reduktaze u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	33
3.8. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost superoksid-dismutaze u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	34
3.9. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost superoksid-dismutaze u gujavici <i>Eisenia andrei</i>	36
4. RASPRAVA.....	38
5. ZAKLJUČAK.....	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

1.1. Selen

Selen je nemetal, srodan telur i sumporu, a otkrio ga je 1817. godine, švedski znanstvenik Jöns Jakob Berzelius. Unatoč tome što je otkriven u prvoj polovici 19. stoljeća, njegova neophodnost za ljude i životinje utvrdila se tek 140 godina poslije njegova otkrića. Otkriće selen i njegove važnosti dovelo je do potrebe za istraživanjem njegova utjecaja na organizme (Sager, 2006). Ime potječe od grčke riječi *selenē*, što znači “Mjesec” jer se uvijek pojavljivao uz telur (lat. *tellus* – Zemlja). Selen pripada skupini halkogenih elemenata, ime skupine potječe od grčkih riječi *chalkos* (ruda) i *genesis* (postanak) što bi u slobodnom prijevodu značilo “ono što sačinjava rude”. U prirodi se često pojavljuje uz sumpor, no u odnosu na njega značajno je manje rasprostranjen (Gupta i Gupta, 2017).

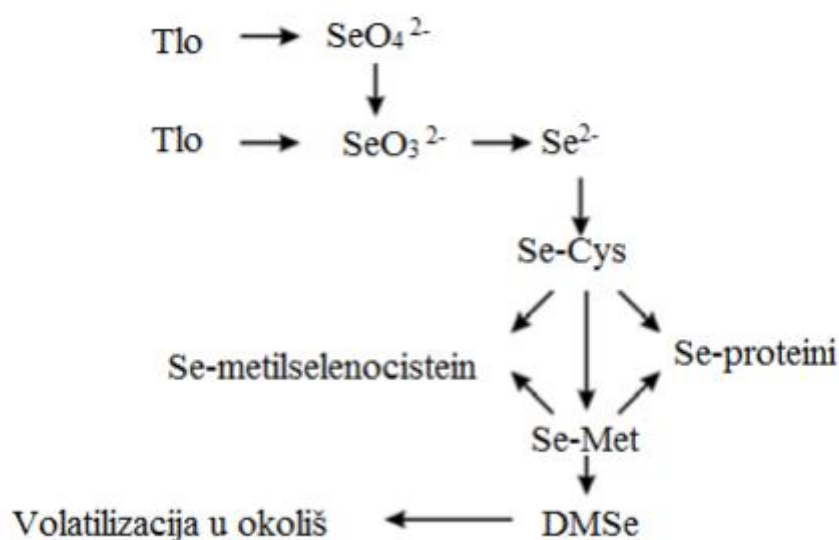
U biotehničkim znanostima, selen se vrlo često proučava zajedno s “teškim metalima”, odnosno s grupom metala i polumetala koji se istražuju s aspekta toksičnog učinka i onečišćenja okoliša. Teške metale po podrijetlu dijelimo na dvije skupine: geogeni i antropogeni teški metali. Geogeno podrijetlo označava dospijevanje teških metala u tlo trošenjem matičnih stijena, dok antropogeno podrazumijeva unos teških metala u tlo uslijed ljudskih djelatnosti poput poljoprivrede, industrije i sl. Zapravo, riječ je o vrlo raznolikoj skupini elemenata s različitim ekološkim i biološkim značajem, a budući da su u većini tla, kao i u biljnim i životinjskim organizmima, prisutni u vrlo niskim koncentracijama (mg kg^{-1} ili manje) nazivaju se “elementi u tragovima” (Lončarić, 2012). Selen se može naći u 5 valentnih stanja kao elementarni selen, selenid, selenit, selenat i tioselenat (Läuchli, 1993). Elementarni selen je stabilan i netopljiv te se u reducirajućim uvjetima stvara iz selenata i selenita. U reakciji s metalima daje jedan elektron čime nastaje ionska komponenta koja sadrži selenidni ion (Se^{2-}). Metalni selenidi najčešći su oblik selen te su široko rasprostranjeni u prirodi (Reilly, 2006). U prirodi, selen dolazi u obliku organskih i anorganskih spojeva. Najvažniji oblici selen koji se efikasno apsorbiraju su anorganski oblici, selenati (SeO_4^{2-}) i seleniti (SeO_3^{2-}), dok organski spojevi selen, aminokiseline poput selenometionina (SeMet) i selenocisteina (SeCys), imaju znatno veću sposobnost zadržavanja u organizmu (Pilon-Smits i Quinn, 2010). Koncentracije selen u različitim dijelovima svijeta su promjenjive te variraju s obzirom na matični supstrat, klimatske prilike i vegetaciju

(Čuvarđić, 2003). Primarni izvor selena u prirodi su vulkanske stijene i metalni sulfidi nastali vulkanskom aktivnosti. Prosječna koncentracija selena u Zemljinoj kori varira od 0.05 do 0.09 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Lakin, 1972). Osim selena u litosferi, atmosferska precipitacija još je jedan izvor selena u tlu. Selen se može naći u atmosferi prirodno, ali i antropogenim utjecajem najviše izgaranjem fosilnih goriva. Tla, biljke, mikroorganizmi, životinje te vulkani otpuštaju do 0.04 ng m^{-3} selena. Antropogeni utjecaj na emisiju selena u SAD-u je vrlo jak, smatra se da se otpušta oko 4670 t selena, dok u Švedskoj i Norveškoj atmosferska precipitacija godišnje iznosi 0.5-1.0 g selena po hektaru (Čuvarđić, 2003). Koncentracije selena u tlu su promjenjive. Sadržaj selena u većini tla varira između 0.01 do 2 mg kg^{-1} , međutim u nekim su područjima, primjerice poput Irske, zabilježene mnogo veće koncentracije selena u tlu od 1200 mg kg^{-1} (Somogyi i sur., 2011). Dosadašnja istraživanja pokazuju da u Republici Hrvatskoj postoje područja, odnosno tla siromašna selenom. Gavrilović i Matešić (1982) u svojim su istraživanjima zabilježili izrazito niske koncentracije selena u tlu i stočnoj hrani u Požeškoj kotlini: u poljoprivrednim tlima 20 - 48 $\mu\text{g kg}^{-1}$, u svim uzorcima pšenice manje od 18 $\mu\text{g kg}^{-1}$, u svim uzorcima kukuruza manje od 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. S obzirom na važnost selena, agronomskom biofortifikacijom se nastoji povećati njegova koncentracija i bioraspoloživost tog elementa u zrnu, čime dolazi i do veće koncentracije tog nutrijenta u samoj biljci. Povećanjem koncentracije selena u zrnu, odnosno biljci, dolazi do povećanja selena u prehrani ljudi te životinja.

1.1.1. Selen u biljkama

Selen je mikronutrijent esencijalan za niže biljke dok sama potreba za njim nije dokazana u višim biljkama (Terry i sur., 2000). U biljke se putem korijena unosi na dva načina - kao selenat (SeO_4^{2-}) i selenit (SeO_3^{2-}). Smatra se kako se nakon unosa prenosi u kloroplaste preko prijenosnika za sulfate, metabolizira se na isti način kao i sulfati, te se reducira i ugrađuje u organske komponente (Elis i Salt, 2003; Tamaoki i sur., 2008). Ako se uspoređuje unos selena u odnosu na sumpor, ne postoji razlika odnosno preferencija jednog od tih elemenata, međutim korijenje korova preferira selen što se tiče same asimilacije u aminokiseline (Ferrari i Renosto, 1972). Nadalje, postoji značajna razlika u mehanizmu uzimanja i transporta selenita i selenata u biljkama. Dumont i sur. (2006) razjasnili su metabolizam selena u biljkama (Slika 1). Ukoliko se selen unosi u obliku selenata, potrebna je njegova redukcija do selenita, a zatim u selenid koji prelazi u selenocisten (Se-Cys) te se dalje

pretvara u selenometionin (Se-Met) i na kraju ugrađuje u Se-proteine ili nastaje Se-metil-selenocistein (SeMetSeCys). Se-Met se povratno pretvara u Se-MetSeCys ili nastaje dimetil-selenid (DMSe) koji volatilizira u okoliš. Arvy (1993) je postavio hipotezu da se seleniti u biljku unose putem pasivne difuzije, dok Li i sur. (2008) pretpostavljaju kako je unos selenita povezan s transportom fosfata. Selenati imaju veću raspoloživost biljkama jer su manje vezani za čestice tla te se lakše ispiru, dok su suprotno tome seleniti čvršće vezani i to najprije na okside aluminija i željeza (Curtin i sur., 2006).



Slika 1. Shematski prikaz metabolizma selena u biljkama (preuzeto i modificirano prema Dumont i sur., 2006)

1.1.1.1. Pregled istraživanja djelovanja selena na različite biljne vrste

Iako nije dokazano da je selen esencijalan za biljke, istraživanja pokazuju da ima pozitivne učinke na biljke, pri čemu taj učinak ovisi o njegovoj koncentraciji (Shankar, 2006). Ríos i sur. (2009) su proveli istraživanje prilikom kojeg su izlagali zelenu salatu različitim koncentracijama selenata i selenita (5, 10, 20, 40, 60, 80 i 120 μM) kako bi utvrdili utjecaj oblika selena i koncentracije na stvaranje i detoksikaciju vodikovog peroksida (H_2O_2). Rezultati su pokazali da je selenat manje toksičan oblik, dok selenit potiče stvaranje veće koncentracije H_2O_2 i veći intenzitet peroksidacije lipida u listovima. Biljke tretirane selenatom potiču aktivnost enzima koji detoksiciraju H_2O_2 , askorbat peroksidazu (APX) i

glutation peroksidazu (GSH-Px), no potiču i akumulaciju neenzimskih antioksidansa askorbata (AsA) i glutaciona. U biljkama selen u niskim koncentracijama djeluje pozitivno na rast, povećava antioksidacijsku aktivnost, djeluje pozitivno na akumulaciju škroba i šećera, smanjuje nastanak reaktivnih kisikovih jedinki i peroksidaciju lipida, odgađa senescenciju i poboljšava rast starijih sjemenki (Xue i sur., 2001; Hartikainen i sur., 2000; Turakainen i sur., 2004). Mnoga istraživanja potvrđuju stimulirajući utjecaj folijarne primjene selen na prinos biljaka (Germ i sur., 2005; Xue i sur., 2001). Turakainen i sur. (2006) su dokazali ulogu selen u usporavanju starenja gomolja i korijena, te su zabilježili veću koncentraciju škroba kod mladih biljaka krumpira koje su tretirane selenom. Hartikainen i sur. (2000) su utvrdili pozitivni učinak selen na prinos kod ljulja, kao i na smanjenje lipidne peroksidacije i povećanje aktivnosti antioksidacijskog enzima GSH-Px. Nadalje, istraživanja su pokazala da selen štiti biljke od negativnog utjecaja teških metala jer selen interferira s primanjem teških metala u biljku kao što su arsen, živa i olovo, te na taj način smanjuje njihovu toksičnost (Ebbs i sur., 2001; He i sur., 2004; Yathavakilla i sur., 2007). Također, dokazano je kako tretmani selenom reguliraju stvaranje jasmonske kiseline i etilena u biljkama te reguliraju proizvodnju proteina potrebnih za obranu od patogena (Tamaoki i sur., 2008). Toksičnost selen za biljke očituje se pri višim koncentracijama. Selen uzrokuje toksičnost putem dva mehanizma – jedan je malformacija selenoproteina, a drugi je indukcija oksidacijskog stresa (Gupta i Gupta, 2016). Istraživanja rađena na ljulju pokazala su da selen može djelovati kao prooksidans u koncentracijama većim od 10 mg kg^{-1} te da može značajno inhibirati klijavost sjemenke, povećati lipidnu peroksidaciju i dehidraciju izdanaka, te smanjiti aktivnost superoksid-dismutaze (Hartikainen i sur., 2000). Visoke koncentracije selen smanjuju aktivnosti superoksid-dismutaze i koncentracije tokoferola u listovima salate (*Lactuca sativa*) (Xue i sur., 2001).

1.1.2. Selen u animalnim organizmima

Selen je esencijalan element za ljude, životinje, bakterije i zelenu algu *Chlamydomonas reinhardtii* (Combs, 2001; Novoselov i sur., 2002). Važnost selen u animalnoj fiziologiji prvo je otkrivena 1957. godine kada se njegov nedostatak povezao s nedostatkom vitamina E, što je rezultiralo bolešću bijelih mišićnih vlakana (Muth i sur., 1957). Međutim, biološki značaj kao strukturalni dio selenoenzima dokazan je tek 1973. godine s otkrićem GSH-Px i njezine uloge u regulaciji oksidativnog procesa i zaštiti stanične

membrane (Liu i sur., 2012). Nedostatak selena onemogućuje sintezu i djelovanje GSH-Px, stoga manjak selena uzrokuje oštećenja stanične membrane (Hefnawy El Ghany i Perez, 2010). Selenoproteini su proteini sa selenocisteinskim ostacima koji imaju antioksidativnu funkciju, uključujući i hvatanje reaktivnih kisikovih jedinki. Uz to, manjak selena povezan je s povećanom mogućnošću razvoja raka kao i neplodnošću kod muškaraca (Ellis i sur., 2004; Diwadkar-Navsariwala i sur., 2006; White i Broadley, 2009). Selen se smatra važnom komponentom funkcionalne hrane, te se u ljudskoj prehrani nedostatak selena povezuje s povećanim rizikom od virusnih oboljenja i bolesti krvožilnog sustava (Beck i sur., 2003). U mnogim zemljama postoji velika količina obradivih površina s niskim koncentracijama selena što posljedično dovodi do smanjenog unosa selena u ljudski organizam (Combs, 2001). Istraživanja pokazuju da nedostatak selena u organizmu dovodi do potencijalnog rizika od obolijevanja od autoimune bolesti (Gärtner i sur., 2002). Osim toga, iako su istraživanja na nižim kralježnjacima oskudna, istraživanja provedena na vrsti ribe *Tor putitora* pokazuju pozitivno djelovanje selena s fizikalno-biokemijskog aspekta (Khan i sur., 2017).

Razlika između količine selena koja je dovoljna kao nutrijent i one koja je toksična za organizam je mala, te je kao rezultat toga i manjak selena i njegova toksičnost vrlo čest problem u svijetu (Terry i sur., 2000). Toksičnost selena u životinja otkrivena je nakon pojave neuroloških i mišićnih problema stoke tijekom 1930. koja se javila zbog prekomjernog uzimanja hrane bogate selenom. Tada se takva bolest nazivala alkalna bolest i neki od simptoma bili su gubitak dlake, anemija, te često i paraliza. U životinja, toksičnost selena očituje se već u ranoj fazi razvoja što ima za posljedicu abnormalni fetalni razvoj kod stoke, divljih svinja i ovaca dok je samo izlaganje selenu primarno kroz hranu, te u nekim područjima s tlom bogatim selenom kroz vodu. Pretjeranim uzimanjem dodataka prehrani sa selenom, kao i pretjeranim unosom hrane koja je bogata selenom, moguće je i trovanje ljudi (Nuttall, 2006).

Istraživanja utjecaja selena najviše su povezivana s ljudima, odnosno ljudskim stanicama, dok je djelovanje selena na druge animalne organizme slabo istraženo.

1.2. Gujavice

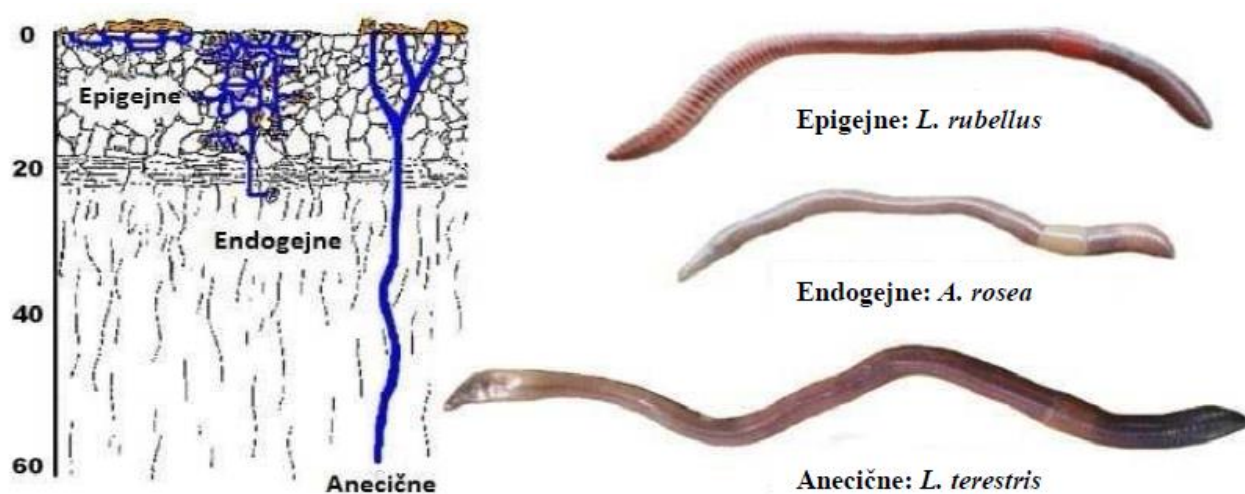
1.2.1. Biologija i ekologija gujavica

Gujavice pripadaju koljenu Annelida (kolutićavci), razredu Clitellata (pojasnici) (malokolutićavci) i podrazredu Oligochaeta (maločetinaši) (Habdija i sur., 2011). Tijelo maločetinaša jasno je segmentirano, te je prekriveno jednoslojnom epidermom i tankom kutikulom koja u većine vrsta omogućuje izmjenu plinova. Na prednjem dijelu tijela imaju prostomij ili akron, dok se na stražnjem dijelu nalazi analni kolutić ili pigidij. Na svakom kolutiću nalaze se četiri snopa četina koje su derivat epiderme i izgrađene su uglavnom od hitina. Celom teloblastičkog podrijetla nalazi se između mišića i probavila. U svakom kolutiću nalaze se lijeva i desna celomska vrećica koje su ispunjene tekućinom što rezultira ulogom hidroskeleta. Kolutićavci imaju ljestvičav živčani sustav, a cerebralni ganglij je u pojasnika pomaknut unatrag. Jednostanični fotoreceptori rasuti po epidermi i nakupine kemoreceptornih stanica na osjetnim završecima iznad kutikule čine osjetilni sustav gujavica. Većina vrsta su detrivori s ekstracelularnom probavom. Glavno obilježje pojasnika, pa stoga i gujavica, je pojas (engl. *clitellum*), odnosno niz kolutića na prednjem dijelu tijela sa zadebljanom žljezdanom epidermom. Pojas izlučuje sluz pri kopulaciji koja sadrži hranjive tvari za jajne stanice i kokon u koji se pohranjuju oplođena jaja. Gujavice su hermafroditi čije su gonade smještene u nekoliko spolnih kolutića u prednjem dijelu tijela, te su raspoređene metamerno u parovima (Habdija i sur., 2011).

Gujavice se smatraju jednom od najvažnijih životinjskih skupina u tlu, te snažno utječu na kemijska svojstva i strukturu tla (Darwin, 1881; Zicsi, 1975). Pojavljuju se diljem svijeta u šumskim, travnjačkim, ali i antropogenim staništima. Vrlo rijetko se nalaze u dijelovima svijeta gdje su ekstremne temperature ili na područjima prekrivenim ledom.

Prema načinu života, morfološkim i fiziološkim značajkama, Bouche (1977) i Lee (1985) su razvrstali vrste gujavica u tri ekološke kategorije (Slika 2):

- **Epigejne gujavice** – pojavljuju se iznad mineralnog sloja tla, ispod biljnih ostataka ili druge organske tvari. Tamno su pigmentirane, male veličine i hrane se neraspadnutim ili malo raspadnutim dijelovima lišća i organske tvari te su vrlo pokretne. Najpoznatiji predstavnici su *Eisenia fetida* i *Lumbricus rubellus*.
- **Endogejne gujavice** – kopaju vodoravne hodnike u tlu koji nisu stalni, najčešće na dubini od 10-15 cm od površine tla. Uglavnom su nepigmentirane, različitih su veličina, sporo se kreću i pod relativno su niskim pritiskom predacije. Najvažniji predstavnici su *Allobophora chlorotica*, *Aporrectodea rosea* i *Aporrectodea caliginosa*.
- **Anecične gujavice** – nastanjuju permanentne okomite hodnike u mineralnom sloju tla, do 3 m dubine. Vrste iz ove skupine su tamne, pigmentirane na dorzalnoj strani tijela, a najvažniji predstavnici ove kategorije su *Lumbricus terrestris* i *Aporrectodea longa*.



Slika 2. Podjela gujavica prema načinu života: epigejne, endogejne i anecične (web 1).

1.2.2. Važnost gujavica za funkcioniranje ekosustava tla

Odum (1969) je definirao ekosustav kao zajednicu bioloških organizama na nekom području koji neprestano izmjenjuju fizičku okolinu, te omogućuju kruženje energije i tvari unutar nekog ekosustava. Tlo je samostalna prirodna tvorevina i primjer ekosustava s velikom bioraznolikošću.

Gujavice pripadaju makrofauni tla te su zbog velike ekološke važnosti, kao i činjenice da predstavljaju glavninu biomase tla, jedna od najbolje istraženih skupina organizama. Zbog održavanja strukture tla i uloge koje imaju u procesu bioturbacije, kao i zbog utjecaja kojeg imaju na druge organizme, nazivaju se „inženjerima“ ekoloških sustava (Kooch i Jalilvand, 2008). Gujavice svojom aktivnošću zauzimaju jednu od glavnih uloga u fragmentaciji, razgradnji i inkorporaciji organske tvari u tlu. Svojim načinom života utječu na formiranje slojeva tla, raspoloživost hranjivih tvari biljkama, na fiksaciju dušika, omjer ugljika i dušika te mnoge druge procese koji se odvijaju u tlu (Edwards i Bohlen, 1996). Nadalje, gujavice imaju kompleksne interakcije s mikroorganizmima. Mikroorganizmi služe kao izvor hranjivih tvari gujavicama, dok pak one povećavaju mikrobnu aktivnost razlažući organsku tvar, ujedno je inokulirajući mikroorganizmima. Povećanom bakterijskom aktivnosti dolazi do remineralizacije anorganske tvari čime one postaju dostupne biljkama (Edwards, 1994). Osim toga, sama disperzija mikroorganizama u uskoj je vezi s kretanjem gujavica u tlu. Gujavice snažno utječu na strukturu, produktivnost i plodnost tla. Formiranje tla je dugoročni proces koji je usko povezan s klimatskim uvjetima i samim razlaganjem minerala i njihovu inkorporaciju u organsku tvar. Već je Darwin (1881) zaključio da gujavice utječu na stvaranje tla. Prodiranjem u dubinu tla povećavaju poroznost, a indirektno svojim ekskrementima unutar tunela kojeg stvaraju obogaćuju čitav profil tla organskom tvari bogatoj mikroorganizmima. Gujavice utječu na samu plodnost tla stvaranjem humusa. Prema nekima smatra se da je humifikacija tla najvažnija uloga gujavica u tlu, a povezana je interakcijom gujavica s mikroorganizmima. Osim toga, gujavice poboljšavaju infiltraciju i procjeđivanja vode u dublje slojeve, tako da se voda i pri jačem intenzitetu padalina ne skuplja na samoj površini tla (Blouin i sur., 2013).

1.2.3. Gujavice kao modelni organizam u ekotoksikološkim istraživanjima

Zbog svog načina života, fizioloških i biokemijskih osobina, gujavice su pogodni organizmi za biomonitoring tla (Sanchez-Hernandez, 2006). Naime, mogućnost tolerancije i bioakumulacije visokih količina endogenih kemikalija, ksenobiotika i tvari antropogenog podrijetla, čini ih dobrim modelima za ekotoksikološke testove (Frund i sur., 2009). Također, tijelo gujavica prekriveno je polupropusnom kutikulom koja omogućuje apsorpciju i bioakumulaciju različitih molekula manje molekularne mase, a istovremeno se odvija i apsorpcija kroz probavni sustav (Phipps i sur., 1993; Sinha i sur., 2010). Upravo zbog direktnog kontakta s tlom te osjetljivosti na promjenjive okolišne čimbenike, smatraju se korisnim modelom u praćenju zagađenja tla. Nadalje, gujavice su lako dostupna vrsta te jednostavna za održavanje i rukovanje prilikom izvođenja eksperimenata što ih čini idealnim eksperimentalnim organizmom (OECD, 1984). Uz to, iako se gujavice zbog svoje jednostavne građe teško mogu usporediti s kralježnjacima, one imaju visoko diferencirane organe i tkiva (Stenersen i sur., 1992) te imunološki sustav koji se može usporediti s onim u kralježnjaka (Goven i sur., 1998). Zbog svega navedenog, moguće je raditi laboratorijska toksikološka ispitivanja koja se mogu do određene razine usporediti sa stvarnim stanjem u okolišu. Standardizirani testovi s gujavicama uključuju dva moguća načina izlaganja toksičnim tvarima: korištenje kontaktnog filter papir testa (48-72 h) i testa s umjetnim tlom (14 dana) (OECD, 1984; ISO, 1993). Najčešće vrste gujavica koje se koriste u takvim testovima su *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) i *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). Iako ni *E. fetida* ni *E. andrei* nisu vrste koje se nalaze prirodno u okolišu, posebice ne u poljoprivrednim tlima, zbog jednostavnost uzgoja se učestalo koriste (posebice za preliminarna istraživanja). Uspoređujući te dvije vrste, *E. andrei* je mnogo produktivnija vrsta u smislu da polaže veći broj kokona, te je time pogodniji organizam za ekotoksikološka istraživanja (Dominguez, 2004).

1.2.4. Istraživanja utjecaja selen na gujovice

Utjecaj selen na organizme u tlu slabo je istraživao. Prve studije o djelovanju selen na gujovice bile su 1989., kad su Serda i Furst odredili LD₅₀ za selenit i selenat, 31 i 60 mg kg⁻¹. U istraživanju Somogyi i sur. (2007) uspoređivala se toksičnost jednog i drugog oblika selen na organizme u tlu, te se selenat pokazao kao toksičniji oblik selen, međutim ne i kod vrste *Lumbricus terrestris*. Naime, u slučaju vrste *L. terrestris* testovi akutne pokazali su da je selenit bio toksičniji od selenata. Daljnjim eksperimentima o učinku selen na organizme u tlu dokazano je da je vrsta *Enchytraeus albidus* osjetljivija u usporedbi s gujavicama na kojim se ispitivao utjecaj selen, poput *Eisenia fetida* i *L. terrestris*. Također je utvrđena korelacija između pH tla i mortaliteta odraslih i juvenilnih jedinki. Najviši mortalitet je bio pri vrijednosti pH koja je niža od 5 (Somogyi i sur., 2012). Istraživanje Richardsona i sur. (2015) ukazalo je na gujovice kao potencijalne izvore „opasnih“ koncentracija žive, selen i olova za njihove predatore. Istraživan je i utjecaj povećanih koncentracija selenita i selenata na gujovice, te je utvrđeno da oba oblika selen imaju značajan utjecaj na sve mjerene parametre (razinu peroksidacije lipida, koncentraciju ukupnog vodikovog peroksida, aktivnost enzima katalaze, glutation-reduktaze i GSH-Px) što ukazuje na poremećaj homeostaze u organizmima (Štolfa i sur., 2017).

1.3. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres se pojavljuje kada dođe do neravnoteže oksidacijsko–redukcijskih procesa zbog prekomjernog stvaranja slobodnih radikala koje stanični homeostatski mehanizmi nisu u mogućnosti neutralizirati (Kelly i sur., 1998). Slobodni radikali najvećim dijelom uključuju reaktivne spojeve kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS). ROS se može podijeliti na dvije skupine: slobodni radikali i neradikalni produkti. Kada dva slobodna radikala dijele njihov nesparen elektron nastaje neradikalni oblik ROS-a. ROS su male, jako reaktivne molekule koje sadrže kisik, poput hidroksilnog radikala $\text{OH}\cdot$, superoksidnoga radikala O_2^- te molekule vodikovog peroksida H_2O_2 (Birben i sur., 2012).

Slobodni radikali predstavljaju kemijske veze koje imaju jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali, a kako su nespareni elektroni obično visokoreaktivni, oni napadaju različita mjesta npr. dvostruke ugljik–ugljik veze u polinezasićenim masnim kiselinama te na taj način stvaraju dodatne intermedijere slobodnih radikala. Takve veze su izuzetno nestabilne i reaktivne zbog nastanka stabilnog spoja, stupaju u reakciju s anorganskim ili organskim spojevima – proteinima, lipidima, ugljikohidratima te nukleinskim kiselinama (Štraus i sur., 2009).

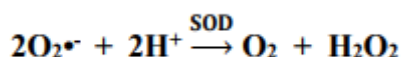
Reaktivni spojevi kisika nastaju svakodnevno u živim organizmima kao rezultat normalnog staničnog metabolizma (Slika 3) i okolišnih faktora (Birben i sur., 2012). Stoga se slobodni radikali prema izvoru od kojeg nastaju dijele na endogene ili egzogene. Endogeni slobodni radikali mogu se generirati aktivacijom imunološke stanice, upale, pretjeranog vježbanja, infekcija, raka i starenja. Egzogeni slobodni radikali nastaju prilikom pušenja, izlaganjem zagađivačima okoliša poput emisije iz automobila i industrije, kontaktom s azbestom, izlaganju ionizirajućem zračenju (Valko i sur., 2007). Pesticidi isto mogu biti uzrok stvaranja ROS-a u organizmu i dovesti do stvaranja oksidacijskog stresa, što pak ukazuje na ulogu ROS-a u toksičnosti pesticida (Yang i Dettbarn, 1996).

1.3.1. Biomarkeri oksidacijskog stresa

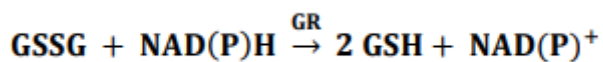
Biomarkeri su sve biokemijske, stanične, histološke ili fiziološke promjene koje su mjerljive u uzorcima tkiva ili tjelesnoj tekućini ili na nivou cijelog organizma, a pružaju rani dokaz izloženosti organizma nekom zagađivalu (Kurelec, 1993). Iz razloga što mnogi antioksidacijski enzimi i nisko molekularni antioksidansi sudjeluju u uklanjanju ROS-a, mijenjanjem njihove aktivnosti i sadržaja omogućuje se evaluacija oksidativnog stresa u organizmu.

1.3.1.1. Antioksidacijski enzimi kao biomarkeri oksidacijskog stresa

Superoksid-dismutaza (engl. *superoxide dismutase* – SOD, EC 1.15.1.1) je metaloprotein koji se nalazi u svim aerobnim organizmima i svim dijelovima u stanici koji su podložni oksidacijskom stresu. Prema mnogima, najučinkovitiji je unutarstanični enzimski antioksidans i predstavlja glavnu staničnu obranu od $O_2^{\bullet-}$ na način da katalizira njegovu dismutaciju u kisik (oksidacija) i H_2O_2 (redukcija) (Bafana i sur., 2011):



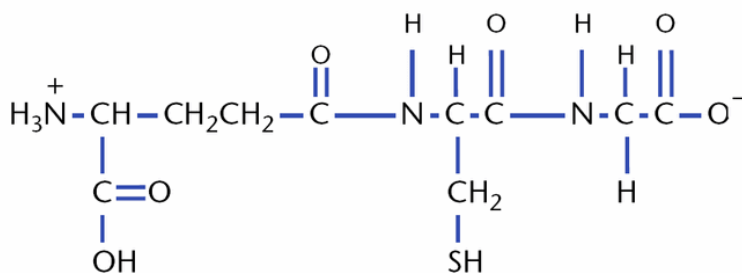
Glutation-reduktaza (engl. *glutathione reductase* – GR, EC 1.6.4.2) je flavin – adenin - dinukleotid (FAD) vezujući homodimerni protein građen od podjedinica od kojih svaka ima četiri definirane domene (Dym i Eisenberg, 2001). Obje podjedinice sudjeluju u izgradnji aktivnog centra što je ključno za njegovu funkciju kao antioksidacijskog enzima (Karplus i Schultz, 1989). GR katalizira reakciju glutation disulfida (GSSG) u sulfhidrilni oblik (GSH), a kao reducens koristi NADPH (Ahmad i Prasad, 2012):



Indikator je redoks stanja u stanicama jer je presudni enzim kod održavanja visokog omjera GSH/GSSG te promjene u njegovoj aktivnosti mogu uvelike narušiti antioksidacijski kapacitet stanice.

1.3.1.2. Glutation – neenzimski biomarker oksidacijskog stresa

Glutation (engl. *glutathione* – GSH; L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicin) je tripeptid niske molekularne mase u animalnim stanicama i jedan je od glavnih čimbenika obrambenih mehanizama od oksidacijskog oštećenja uslijed povećane koncentracije ROS-a (Slika 3).

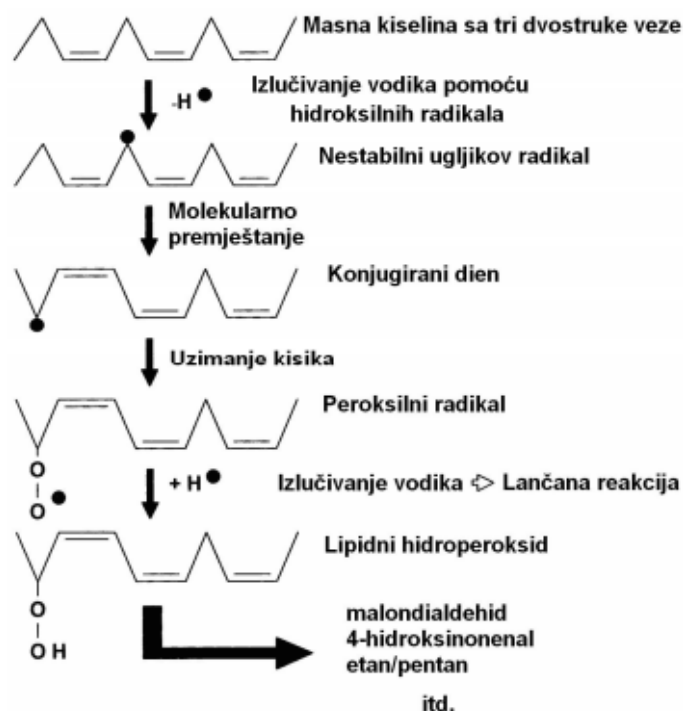


Slika 3. Glutation (web 2).

GSH je važan derivat aminokiselina i ima nekoliko važnih uloga: brzo reagira s hidroksilnim radikalima, citotoksičnim produktima Fentonove reakcije, peroksinitritima, citotoksičnim produktima koji nastaju prilikom spajanja dušikovog monoksida s O₂ i O₂^{•-} (Kalyanaraman i sur., 1996; Luperchio i sur., 1996). Osim toga, GSH ima važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima kao što je prijenos signala, regulacija transporta sulfata, konjugacija metabolita, detoksifikacija ksenobiotika (Anjum i sur., 2012). U reakcijama koje katalizira GSH-Px, GSH sudjeluje i u reduktivnoj detoksifikaciji H₂O₂ i lipidnih peroksida. Nadalje, sudjeluje u redukciji disulfidnih mostova i održavanju proteina u odgovarajućem oksidiranom, odnosno reduciranom stanju (Kaplowitz i sur., 1985). GSH bitna je komponenta antioksidacijskog sustava jer sudjeluje u uklanjanju ¹O₂, H₂O₂ i OH[•] te je ključan čimbenik u regeneraciji askorbata u askorbat glutationskom ciklusu. Svakom navedenom reakcijom, direktno ili indirektno nastaje glutathion disulfid (GSSG), tj. dolazi do oksidacije GSH (Kehrer i Lund, 1994). Djelovanjem glutathion reduktaze GSSG se može povratno reducirati do GSH, koristeći NADPH kao izvor elektrona. Omjer GSH i GSSG se u istraživanjima koristi kao marker oksidacijskog stresa, a u većini stanica omjer GSH-a u odnosu na GSSG veći je od 500 (Berg i sur., 2013).

1.3.1.3. Lipidna peroksidacija kao biomarker oksidacijskog stresa

Lipidna peroksidacija smatra se procesom koji dovodi do najvećeg oštećenja u svakom živom organizmu, a definira se kao složen niz reakcija razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acid*; PUFA) koja je potaknuta reaktivnim dušikovim jedinkama i reaktivnim spojevima kisika (Slika 4) (Svingen i sur., 1978).



Slika 4. Osnovni niz reakcija lipidne peroksidacije (preuzeto i modificirano prema Young i McEneny, 2001).

Proces lipidne peroksidacije dijeli se na tri osnovna stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal, međutim i pojedini drugi radikali mogu pokrenuti reakciju peroksidacije. Prvi produkti peroksidacije su lipidni hidroperoksidi, mono *trans* – konjugirani dieni, koji se razgrađuju do aldehida u prisustvu metalnih iona, pa do konačnih produkata pomoću kojih se može utvrditi stanje oksidacijskog stresa (Esterbauer i sur., 1989). Glavni produkt lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA) koji reagira s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA) te na taj način služi kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja tkiva. Uslijed lipidne peroksidacije dolazi do promjena u strukturi i fluidnosti membrana, a posljedično time dolazi do promjene u transportu iona, odnosu receptor/ligand te osmotskom gradijentu (Webb i sur., 2008).

1.4. Ciljevi istraživanja

Selen je element u tragovima koji ovisno o koncentraciji može imati dvojak učinak – u niskim koncentracijama djeluje kao važan mikronutrijent za ljude, biljke i životinje, a u visokim koncentracijama može imati toksični učinak na organizme u okolišu. Do sada je učinak selena na organizme u tlu slabo istražen. Koncentracije selena u tlu mogu jako varirati, a moguć je i veći unos selena u ekosustave tla kao posljedica njegove primjene u biofortifikaciji. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio proučiti djelovanje dva oblika selena (selenita i selenata) na gujavice, posebice na oksidacijski i antioksidacijski odgovor, kako bi se utvrdilo može li povećani unos selena u ekosustav tla značajno utjecati na organizme u tlu.

Ciljevi istraživanja:

- odrediti mortalitet tj. LC_{50} vrijednosti za oba oblika selena, selenit i selenat
- odrediti utjecaj različitih koncentracija selenita na oksidacijski i antioksidacijski odgovor gujavica vrste *Eisenia andrei*
- odrediti utjecaj različitih koncentracija selenata na oksidacijski i antioksidacijski odgovor gujavica vrste *Eisenia andrei*
- utvrditi postoje li razlike između dva oblika selena, selenita i selenata, u oksidacijskom i antioksidacijskom odgovoru gujavica vrste *Eisenia andrei*

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Eksperimentalni organizam

2.1.1. Sistematika i biologija eksperimentalnog organizma - gujavice (*Eisenia andrei*)

Carstvo:	Animalia
Koljeno:	Annelida
Razred:	Clitellata
Podrazred:	Oligochaeta
Red:	Haplotaxida
Porodica:	Lumbricidae
Rod:	<i>Eisenia</i>
Vrsta:	<i>Eisenia andrei</i>



Slika 5. Eksperimentalni organizam – gujavica (*Eisenia andrei*) (web 3).

Eisenia andrei (Slika 5), prema načinu života, fiziološkim i morfološkim osobinama pripada epigejnim vrstama gujavica koje žive u površinskim slojevima tla bogatim organskim materijalom, a manje u tlima bogatima mineralnim tvarima. Prema OECD protokolu preporučena je vrsta za toksikološke testove (OECD, 1984). Vrsta je koja ima kratak životni ciklus čije izlijevanje iz kokona traje tri do četiri dana, dok spolnu zrelost, na temperaturi od 20 °C postiže sa sedam do osam tjedana. Smatra se vrlo plodnom vrstom jer svaka jedinka proizvede dva do pet kokona tjedno. Zbog jednostavnog održavanja i uzgoja te lake dostupnosti, korištena je kao eksperimentalni organizam.

2.1.2. Održavanje gujavica u laboratoriju i priprema za eksperiment

Gujavice koje su korištene u istraživanju potječu od lokalnog dobavljača OPG Škrljak i aklimatizirane su u laboratoriju. Za eksperiment su odabrane odrasle gujavice s dobro izraženim pojasom.

2.2. Određivanje mortaliteta gujavica pomoću kontaktnog filter papir testa

Dan prije početka eksperimenta odrasle gujavice su stavljene na prethodno navlažen filter papir u Petrijeve zdjelice, kako bi se probavni trakt očistio od zemlje. Pri tome, Petrijeve zdjelice bile su prekrivene aluminijskom folijom koja je perforirana kako bi gujavice imale dovoljno zraka te su ostavljene na 20 °C u tami.

U istraživanju je primijenjen kontaktni filter papir test (engl. *filter paper contact test*) (OECD, 1984). Gujavice su se nakon čišćenja probavila, izlagale ispitivanoj kemikaliji (selenu u obliku selenita i selenata) i to u staklenim posudicama s ravnim dnom čija se površina obložila filter papirom (površina 105 cm²) bez preklapanja. U svaku bočicu se stavila po jedna gujavica te su nakon toga bočice zatvarane poklopcem s malim otvorom na vrhu zbog ventilacije i odložene u tamnu komoru na temperaturu 20 °C (Slika 6).



Slika 6. Prikaz izlaganja gujavica selenitu i selenatu uz pomoć kontakt testa na papiru
(fotografirala: Anja Petek)

Koncentracija testne tvari izražavala se po površini filter papira. Za pripremu različitih koncentracija selenita i selenata korištena je destilirana voda, dok je kontrola sadržavala samo destiliranu vodu. Aplicirani volumen selenita i selenata iznosio je 2 mL po bočici. Test je trajao 48 h, a mortalitet se pratio nakon 24 i 48 h. Gujavice su se smatrale mrtvima ako nisu odgovarale na blagi podražaj na prednjem dijelu tijela.

U svrhu određivanja srednje letalne koncentracije (LC_{50}) najprije je provedeno preliminarno izlaganje na temelju kojeg su utvrđene koncentracije za konačni test. Eksperiment je ponovljen tri puta, a u konačnom testiranju priređeno je sedam koncentracija za selenit i jednak broj koncentracija za selenat (Tablica 1). Korišteno je 10 gujavica po koncentraciji za svaki pojedini oblik selen.

Tablica 1. Koncentracije korištene za određivanje srednje letalne koncentracije (LC_{50})

	SELENAT	SELENIT
KONTROLA	0	0
C1 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	1	0.5
C2 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2	1
C3 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	5	2.5
C4 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	10	5
C5 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	50	7.5
C6 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	75	10
C7 ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	100	25

2.3. Izlaganje gujavica u svrhu određivanja oksidacijskog statusa

Na temelju rezultata mortaliteta, odabrane su koncentracije za izlaganje gujavica u svrhu određivanja biomarkera. Sve odabrane koncentracije bile su subletalne i nisu uzrokovale nikakve morfološke promjene u gujavica.

Kako bi odredili oksidacijski status gujavica nakon izlaganja selenu, koristio se kontaktni filter papir test. U kontaktnom filter papir testu oba oblika selen nanosila su se na filter papir te su gujavice bile izložene selenu samo dermalno. Gujavice su bile izložene 48 h u tami, te su nakon isteka vremena izlaganja korištene za pripremu uzoraka za daljnje analize. U svrhu određivanja lipidne peroksidacije i ukupnih proteina, te mjerenja aktivnosti GR-a i SOD-a korišteno je 5 koncentracija selenita: 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ i 5 koncentracija selenata: 0.2, 0.5, 1, 2, 5 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Svako koncentraciji izloženo je 9 gujavica. Za određivanje omjera GSH/GSSG izloženo je 9 gujavica po koncentraciji, a korištene su 3 koncentracije selenita: 0.1, 0.5 i 2.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$, te 3 koncentracije selenata: 0.2, 1, 5 $\mu\text{g cm}^{-2}$.

2.4. Mjerenje biomarkera oksidacijskog stresa

Mjerenje biomarkera oksidacijskog stresa provedeno je u Laboratoriju za biokemiju na Odjelu za biologiju u Osijeku. Istraživanje je uključivalo pripremu uzoraka i mjerenje slijedećih parametara u gujavicama izloženim selenu u obliku selenita i selenata:

- određivanje lipidne peroksidacije
- određivanje ukupnog glutationa (tGSH), oksidiranog glutationa (GSSG) i reduciranog glutationa (GSH)
- mjerenje aktivnosti GR-a
- mjerenje aktivnosti SOD-a
- određivanje koncentracije ukupnih proteina

2.4.1. Priprema uzorka za mjerenje produkata lipidne peroksidacije

Kako bi se odredila količina produkata lipidne peroksidacije, gujavice prethodno izložene selenitu i selenatu vagane su u staklenim kivetama te je na tkivo dodana 1.15% otopina KCl-a u omjeru 1:10 (w/v) nakon čega je uzorak homogeniziran Ultra turrax T10 homogenizatorom (1300 rpm; IKA, Königswinter, Njemačka). Dobiveni homogenat se dalje koristio za određivanje lipidne peroksidacije.

2.4.2. Određivanje lipidne peroksidacije

Razina lipidne peroksidacije u homogenatima gujavica utvrđena je metodom koja se temelji na spektrometrijskom mjerenju koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS), većinom malondialdehida (MDA), dok je sama metoda je opisana od strane Okhawa i sur. (1979).

Neposredno nakon homogenizacije, otpipetirano je 0.4 mL homogenata, te dodavano redom: 0.2 mL 8.1% natrijeva dodecil sulfata, 1.5 mL 20% octene kiseline, 1.5 mL 0.8% tiobarbiturne kiseline (TBA), nakon toga smjesa je promješana na vortexu. Nakon toga, u smjesu je dodano 0.4 mL vode kako bi ukupan volumen reakcijske smjese bio 4 mL. Reakcijska smjesa inkubirana je 60 min na 95 °C. Zbog visoke temperature kojoj je izložena kisela reakcijska smjesa, došlo je do razgradnje lipidnih peroksida te je nastali MDA reagirao s TBA što je za posljedicu imalo crveno obojenje smjese. Nakon inkubacije, uzorak je hlađen 15 min na sobnoj temperaturi te je uzorku dodan 1 mL destilirane vode i 5 mL n-butanola i piridina u međusobnom omjeru 15:1 (v/v). Reakcijska smjesa je nakon vorteksiranja, centrifugirana 15 min na 4000 g na temperaturu od 4 °C što je uzrokovalo nastajanje dva sloja. Koncentracija TBARS-a mjerena je spektrofotometrijski na valnoj duljini 532 nm u gornjem sloju prethodno pripremljene reakcijske smjese.

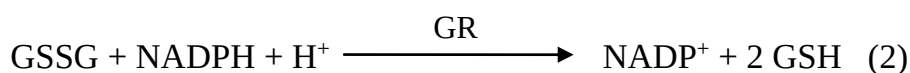
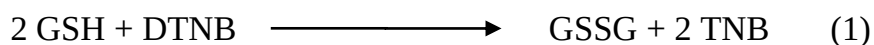
Količina TBARS-a tj. MDA određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama gdje je 1,1,3,3 – tetrametoksiopropan korišten kao standard. Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol g⁻¹ svježe tvari).

2.4.3. Priprema uzorka za mjerenje ukupnog, oksidiranog i reduciranog glutathiona

Za određivanje tGSH, GSSG i GSH koriste se svježe gujavice koje su prethodno 48 h bile izložene različitim koncentracijama selenita i selenata pomoću kontakt testa na filter papiru. Potom je 100 mg tkiva homogenizirano u 1 mL 5% otopine 5-sulfosalicilne kiseline. Homogenat je ostavljen 10 min na ledu te je nakon toga centrifugiran 10 min pri 10 000 g na 4 °C. Nakon toga, supernatant se čuvao na ledu do mjerenja.

2.4.4. Određivanje ukupnog, oksidiranog i reduciranog glutathiona

Ukupni glutathion mjeri se kinetičkim metodom, u kojoj GSH uzrokuje kontinuiranu reakciju 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoične kiseline (DTNB) uslijed koje nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB), pri čemu nastaje GSSG koji se reciklira pomoću enzima GR-a i NADPH (jednadžbe (1) i (2); Akerboom i Sies, 1981; Nair i sur., 1991). Uslijed nastanka TNB-a dolazi do porasta apsorbancije koja se mjeri na 412 nm.



Nakon pripreme ekstrakta za određivanje ukupnog glutathiona, slijedila je priprema reakcijskog koktela koji se sastojao od 8 mL 100 mM natrij – fosfatnog pufera (pH 7.0) s dodatkom 1 mM EDTA, 228 µL otopine GR (6U/mL) i 228 µL otopine DTNB koncentracije 1.5 mg mL⁻¹. Zatim je u UV/VIS kivetu dodano 750 µL reakcijskog koktela, 50 µL razrijeđenog uzorka i 250 µL NADPH (0.16 mg mL⁻¹). Porast apsorbancije pratio se na 412 nm tijekom 5 min.

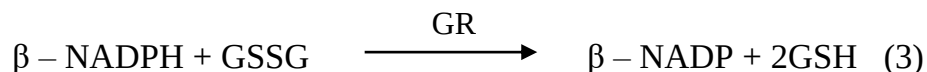
Kako bi se odredio GSSG, u 500 µL uzoraka je dodano 10 µL vinilpiridina i 25 µL trietanolamina. Uzorci su potom inkubirani te je sadržaj oksidiranog glutathiona određen istom kinetičkim analizom kao i ukupni glutathion. Pomoću standardne krivulje GSH-a i GSSG-a određena je količina ukupnog i oksidiranog glutathiona. Konačni rezultati izraženi su kao omjer količina GSH/GSSG.

2.4.5. Priprema uzoraka za mjerenje glutathion-reduktaze i superoksid-dismutaze te određivanje koncentracije proteina

Nakon isteka vremena izlaganja gujavice su vagane te je na 100 mg tkiva dodano 500 μ L ekstrakcijskog pufera (50 mM natrij – fosfatni pufer, pH 7.8 uz dodatak 1 mM EDTA). Nakon toga tkivo je homogenizirano pomoću Ultra turrax T10 homogenizatora (1300 rpm; IKA, Königswinter, Njemačka). Enzimi su zatim ekstrahirani stajanjem 10 min na ledu te centrifugiranjem 30 min na 9000 g i 4 °C. Dobiveni supernatanti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima GR-a, SOD-a te određivanje koncentracije proteina.

2.4.6. Određivanje aktivnosti enzima glutathion-reduktaze

U enzimskim ekstraktima aktivnost GR-a određena je prema metodi koju su opisali Dolphin i suradnici (1989). Prema toj metodi dolazi do redukcije GSSG-a uz prisustvo GR-a koristeći NADPH kao reducens (jednadžba 3).



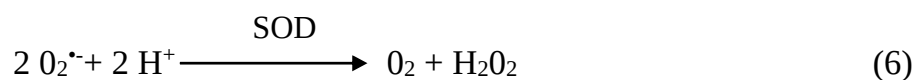
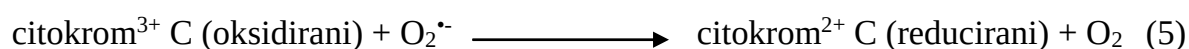
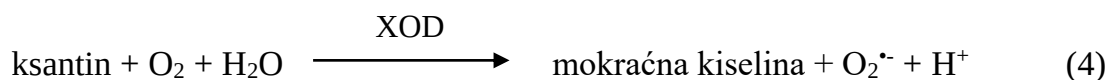
U kvarcnu kivetu dodano je 400 μ L reakcijskog pufera (100 mM natrij-fosfatni pufer pH 7.5, 1 mM EDTA), 500 μ L 2 mM otopine GSSG, 50 μ L enzimskog ekstrakta koji je prethodno razrijeđen 2 $\times$ te 50 μ L 2 mM otopine NADPH.

Nakon dodatka NADPH započinje enzimska reakcija, a prati se pad apsorbancije na 340 nm svakih 10 s tijekom 2 min, koji nastaje uslijed oksidacije NADPH odnosno smanjenja količine NADPH.

Jedna jedinica enzima reducira 1 μ mol GSSG po min pri pH 7.6 i 25 °C. Specifična aktivnost GR-a izražena je kao količina (μ mol) NADPH po min po gramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 6.220 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GR-a po gramu proteina ($\text{U g}^{-1} \text{ proteina}$; $\text{U} = \mu\text{mol min}^{-1}$).

2.4.7. Određivanje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze

Aktivnost SOD-a u ekstraktima mjeri se kao stupanj inhibicije redukcije citokroma C superoksidnim radikalom, a određena je metodom koju su opisali Flohé i Otting (1971). Jedna jedinica SOD-a inhibira stopu redukcije citokroma C za 50%, pomoću ksantin oksidaze (XOD) i ksantina u nekom povezanom sustavu (jednadžbe (4), (5), (6)).



U VIS kivetu za mjerenje redom je pipetirano 1450 μL reakcijskog koktela, koji se sastojao od 0.05 mM otopine citokroma C priređene u 50 mM natrij fosfatnom (pH 7.8) puferu koji je sadržavao 0.1 mM EDTA (pH 7.8), pomiješan sa 1 mM otopinom ksantina, zatim 25 μL enzimskog ekstrakta te 25 μL otopine XOD koncentracije 0.1 U mL^{-1} . Pratio se porast apsorbancije na 550 nm tijekom 3 min, svakih 30 s, dok je sama aktivnost računata koristeći postotak inhibicije citokroma C te je izražena kao U mg^{-1} proteina.

2.4.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Za određivanje ukupne koncentracije proteina u ekstraktima, koristila se metoda po Bradfordu (1976), koja se bazira na vezanju proteina s bojim Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. Hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama boja se veže na proteine, te se na taj način stabilizira u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene iz smeđe u plavu. Uzorci su prije mjerenja razrijeđeni 100×, nakon razrjeđivanja u epruvetu je dodano 100 µL razrijeđenog uzorka i 1 mL reagensa Bradford. Apsorbancija se mjeri pri 595 nm prema slijepoj probi koja se sastojala od 100 µL pufera i reagensa. Koncentracija proteina određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama gdje je albumin goveđeg seruma korišten kao standard, te su rezultati izraženi u mg mL⁻¹.

2.4.9. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA), a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Za određivanje krivulje mortaliteta korišten je statistički program R verzije 3.1.2. Mortalitet je izračunati na osnovu broja životinja umrlih tijekom tretiranja gujavica različitim koncentracijama selenita i selenata te je izražen kao postotak mortaliteta. Smrtnost nije zabilježena u kontrolnoj skupini. *Logit* procedura drc paketa u R-u korištena je za izračun letalnih koncentracija (LC). Za izradu doza-odgovor krivulja mortaliteta korištena je četiri parametarska logistička krivulja. Distribucija podataka testirana je Shapiro-Wilk testom. Budući da je utvrđena normalna distribucija, za daljnje analize koristila se parametarska statistika. Razlike između kontrolne i skupina izloženih različitim koncentracijama selenita i selenata uspoređene su pomoću jednosmjerne analize varijance (*one-way* ANOVA). Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, proveden je Bonferroni *post hoc* test kako bi se odredilo koje se skupine razlikuju. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

3.1. Određivanje mortaliteta gujavici *Eisenia andrei* tretiranih selenitom i selenatom

LC₁₀, LC₅₀ i LC₉₀ vrijednosti za selenat i selenit u gujavici *Eisenia andrei* izračunate su na temelju rezultata mortaliteta 48 h nakon izlaganja dvama oblicima selena (Tablica 2., Tablica 3.), a rezultati su prikazani i doza-odgovor krivuljom (Slika 7).

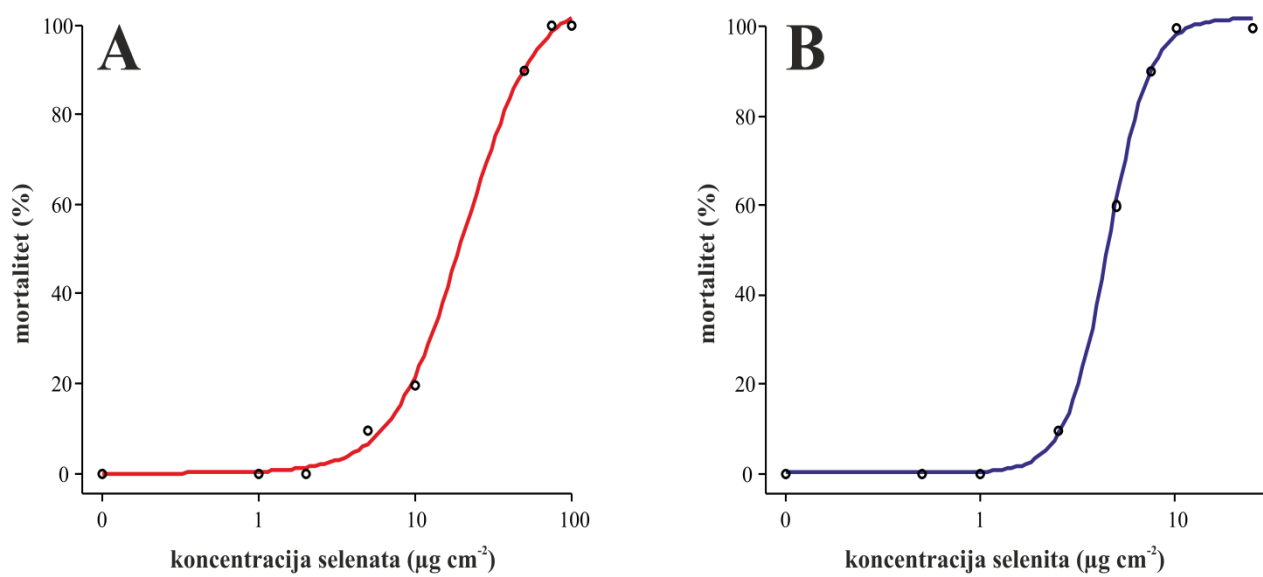
Tablica 2. LC₁₀, LC₅₀ i LC₉₀ vrijednosti za selenat u gujavici *Eisenia andrei* 48 h nakon izlaganja.

		Koncentracija selenata (µg cm ⁻²)	Gornji limit	Donji limit
SELENAT	LC ₁₀	6.522	8.360	4.684
	LC ₅₀	20.706	26.234	15.178
	LC ₉₀	65.735	102.028	29.442

Tablica 3. LC₁₀, LC₅₀ i LC₉₀ vrijednosti za selenit u gujavici *Eisenia andrei* 48 h nakon izlaganja.

		Koncentracija selenita (µg cm ⁻²)	Gornji limit	Donji limit
SELENAT	LC ₁₀	2.618	2.957	2.279
	LC ₅₀	4.539	4.785	4.294
	LC ₉₀	7.872	8.700	7.043

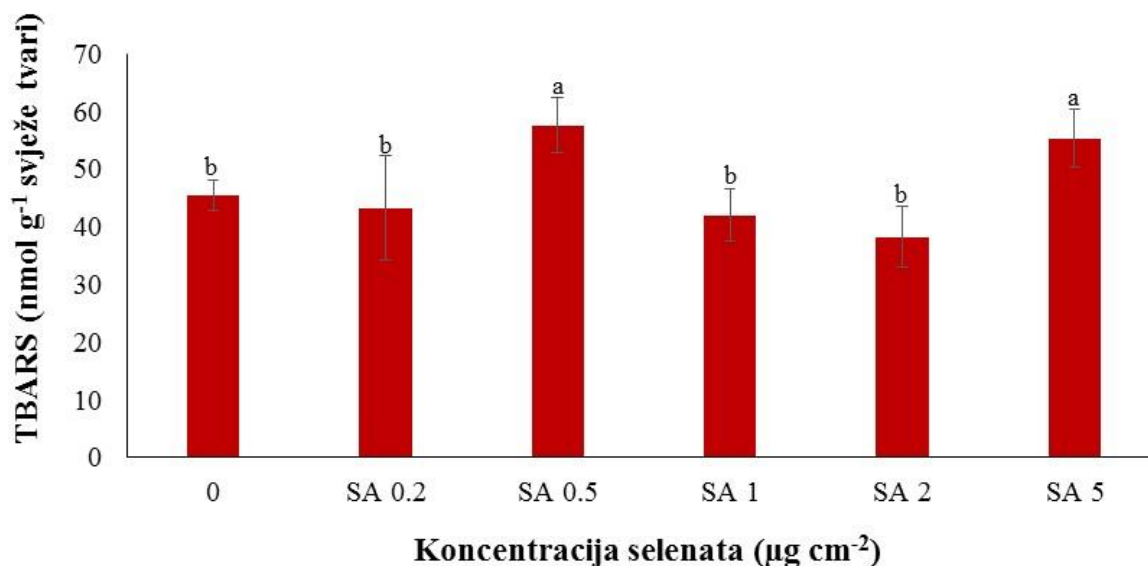
Usporedbom LC₅₀ vrijednosti za oba oblika selena – selenita i selenita - uočava se razlika između vrijednosti letalnih koncentracija. LC₅₀ kod gujavica tretiranih selenitom je 5 puta manja od gujavica tretiranih selenatom. Nakon određivanja rezultata mortaliteta određene su koncentracije za mjerenje biomarkera oksidacijskog stresa.



Slika 7. Doza-odgovor krivulje u gujavici *Eisenia andrei* nakon izlaganja 48 h različitim koncentracijama selenata (7A) i različitim koncentracijama selenita (7B).

3.2. Utjecaj različitih koncentracija selenata na razinu lipidne peroksidacije u gujavici *Eisenia andrei*

Razina lipidne peroksidacija praćena je mjerenjem količine TBARS-a. Rezultati (Slika 8) su pokazali statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine koja je bila izložena koncentraciji selenata $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ i $5 \mu\text{g cm}^{-2}$. Količina TBARS-a nakon izlaganja gujavica koncentraciji selenata $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ iznosila je $57.581 \pm 4.794 \text{ nmol g}^{-1}$ svježe tvari, odnosno povećala se u odnosu na kontrolnu skupinu za 26.59%, dok je u skupini gujavica tretiranih $5 \mu\text{g cm}^{-2}$, količina TBARS-a bila $55.324 \pm 5.024 \text{ nmol g}^{-1}$ svježe tvari, tj. imala je značajan porast od 21.62%. Kod skupina koje su bile izložene selenatu koncentracijama 0.2, 1 i $2 \mu\text{g cm}^{-2}$ nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.

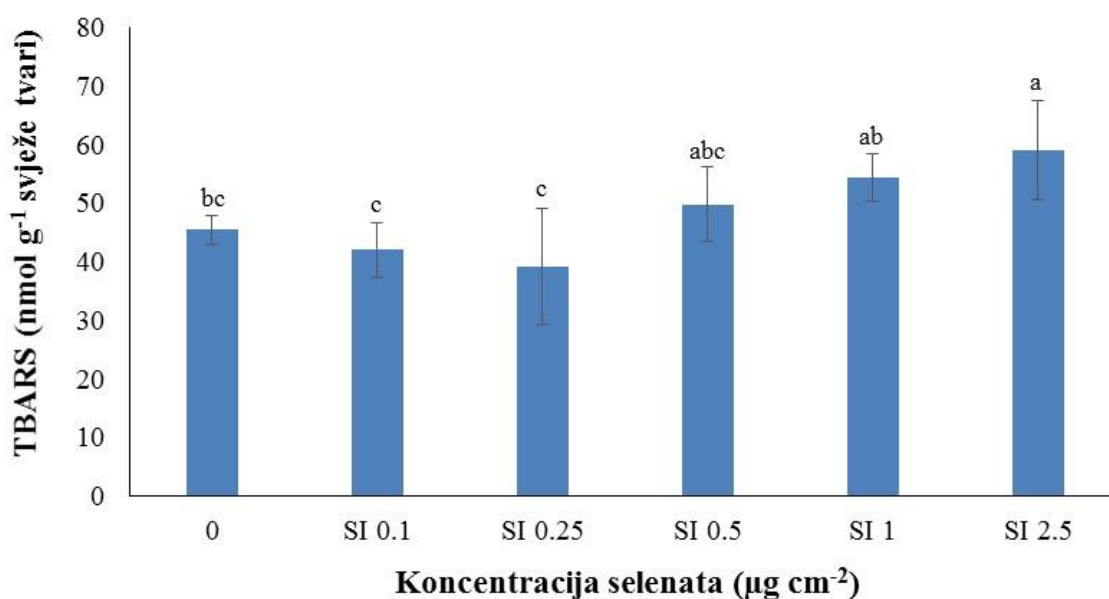


Slika 8. Količina TBARS-a mjerena u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenata (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,
SA 0.2 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $0.2 \mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 0.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $1 \mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 2 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $2 \mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $5 \mu\text{g cm}^{-2}$.

3.3. Utjecaj različitih koncentracija selenita na razinu lipidne peroksidacije u gujavici *Eisenia andrei*

Rezultati mjerenja (Slika 9) pokazuju da je statistički značajan porast količine TBARS-a prisutan samo u skupini koja je bila izložena najvećoj testiranoj koncentraciji selenita, odnosno $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ gdje se količina TBARS-a povećala za 29.71%, odnosno iznosila je $59.002 \pm 8.438 \text{ nmol g}^{-1}$ svježe tvari. Statistički značajne razlike između kontrolne skupine i skupina gujavica koje su bile izložene koncentracijama selenita 0.1, 0.25, 0.5 i $1 \mu\text{g cm}^{-2}$ nisu utvrđene.



Slika 9. Količina TBARS-a mjerena u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenita (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,

SI 0.1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.1 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 0.25 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.25 \mu\text{g cm}^{-2}$,

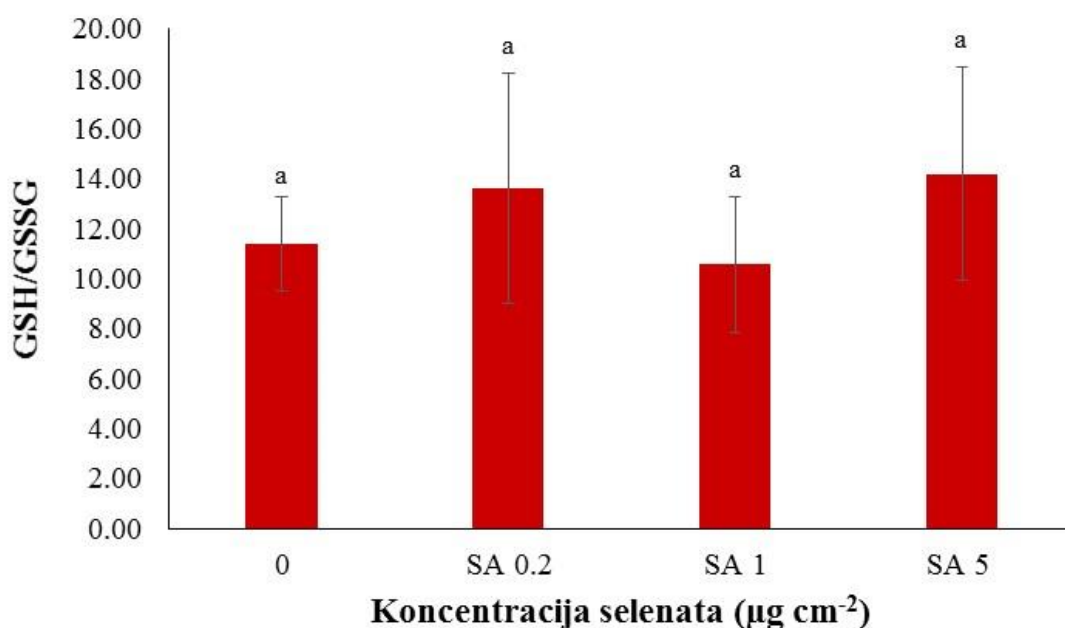
SI 0.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $1 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 2.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$.

3.4. Utjecaj različitih koncentracija selenata na omjer reduciranog i oksidiranog glutationa u gujavici *Eisenia andrei*

Rezultati (Slika 10) pokazuju da tretman različitim koncentracijama selenata ne utječe značajno na omjer GSH/GSSG. Iako postoji povećanje omjera GSH/GSSG u skupinama tretiranim najmanjoj i najvećoj koncentracijom selenata u odnosu na kontrolnu skupinu, samo povećanje nije statistički značajno.

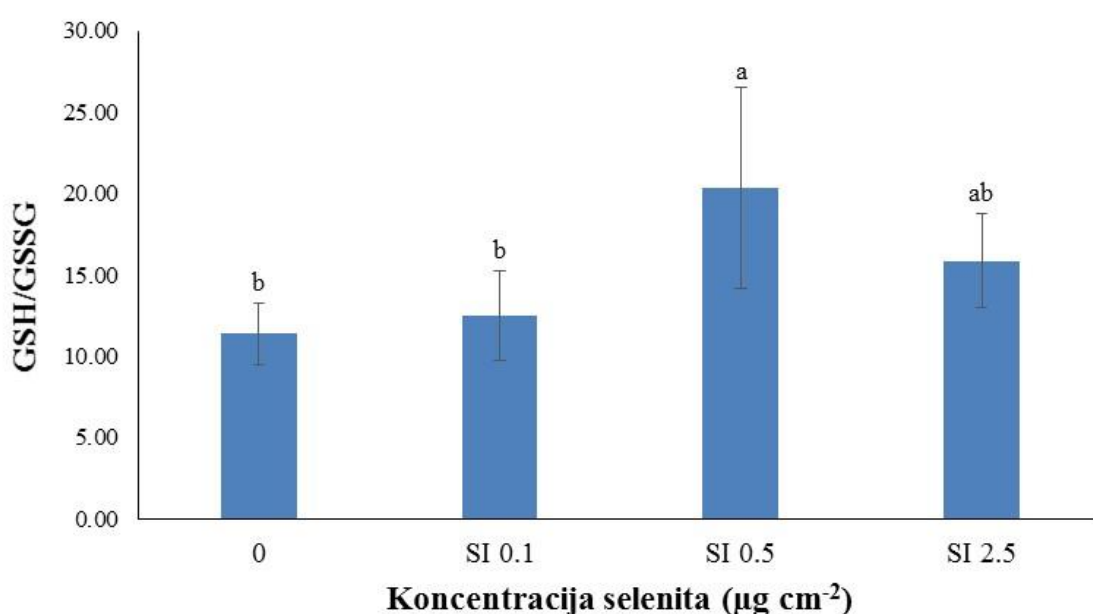


Slika 10. Omjer GSH/GSSG mjereno u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenata (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,
SA 0.2 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $0.2 \mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $1 \mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $5 \mu\text{g/cm}^{-2}$.

3.5. Utjecaj različitih koncentracija selenita na omjer reduciranog i oksidiranog glutationa u gujavici *Eisenia andrei*

Rezultati (Slika 11) pokazuju da izlaganje gujavica koncentraciji selenita $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ značajno utječe na povećanje omjera reduciranog i oksidiranog glutationa. Omjer GSH/GSSG u skupini gujavica izloženim koncentracijom selenita $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ iznosio je 20.315 ± 6.181 , što je u odnosu na kontrolu, povećanje se za 39%. U skupinama gujavica tretiranim koncentracijama selenita 0.1 i $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ postoji trend povećanja omjera GSH/GSSG, međutim povećanje nije statistički značajno.



Slika 11. Omjer GSH/GSSG mjereno u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenita (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,

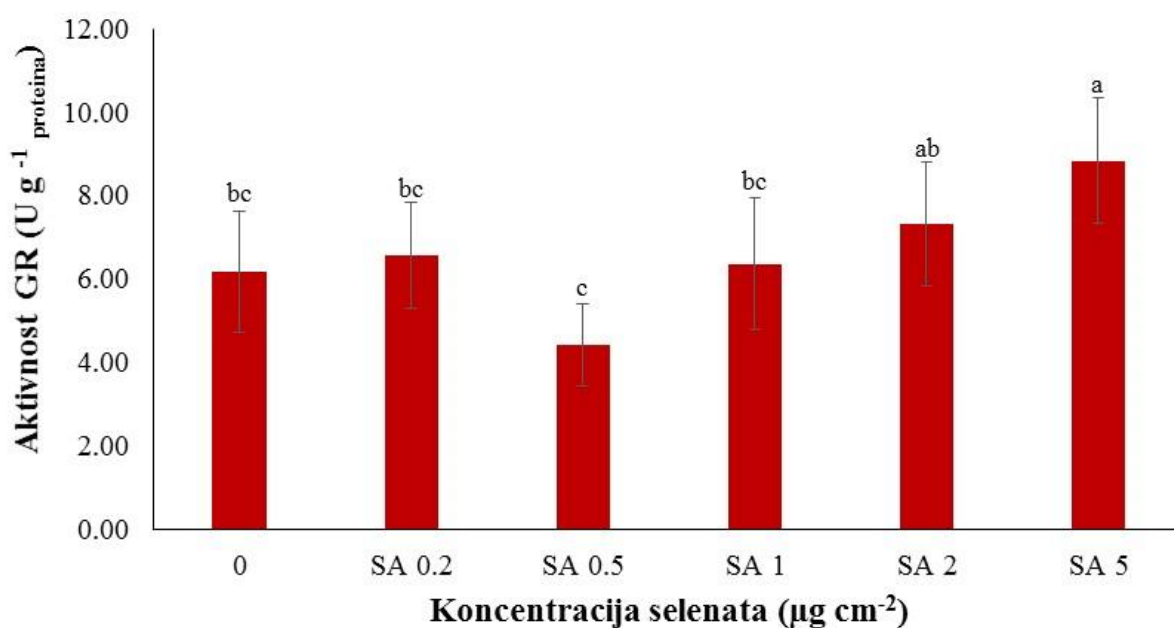
SI 0.1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.1 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 0.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 2.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$.

3.6. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost glutathion-reduktaze u gujavici *Eisenia andrei*

Aktivnost GR-a nije se značajno promijenila kod gujavica koje su izložene koncentracijama selenata 0.2, 0.5, 2 i 2 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Slika 12). Međutim, najveća testirana koncentracija selenata (5 $\mu\text{g cm}^{-2}$) pokazuje statističku značajnu razliku u odnosu na kontrolu, tj. zabilježena je povećana aktivnost GR-a, $8.831 \pm 1.498 \text{ U g}^{-1}$ proteina. U odnosu na kontrolnu grupu, aktivnost GR-a u skupini gujavica tretiranih koncentracijom selenata 5 $\mu\text{g cm}^{-2}$, povećala se za 42.89%.

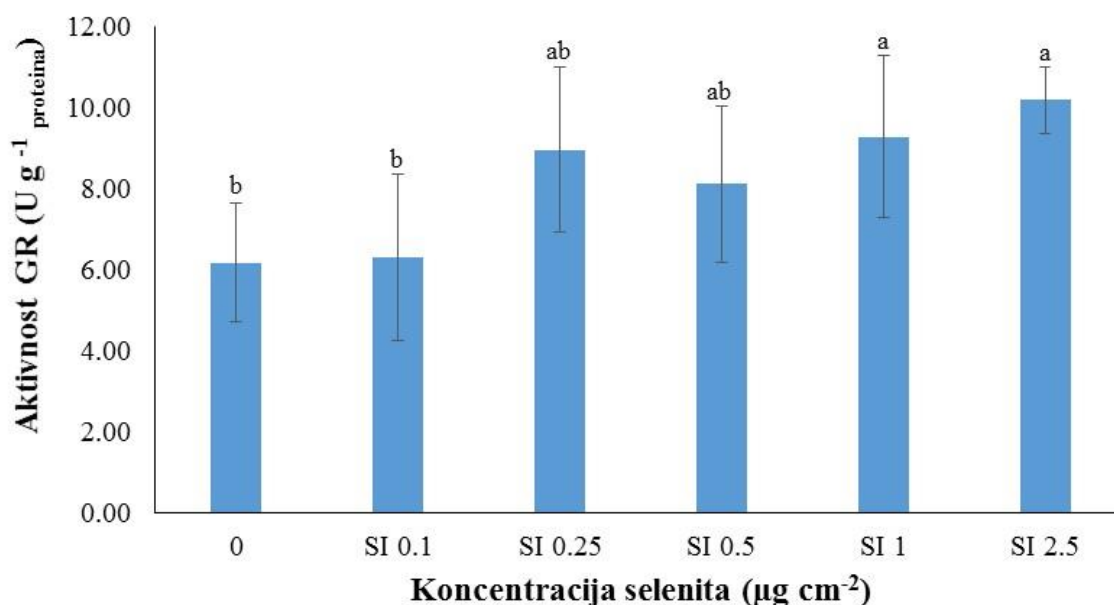


Slika 12. Aktivnost glutathion-reduktaze mjerena u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenata (srednja vrijednosti $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,
SA 0.2 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata 0.2 $\mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 0.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata 0.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata 1 $\mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 2 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata 2 $\mu\text{g cm}^{-2}$,
SA 5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata 5 $\mu\text{g cm}^{-2}$.

3.7. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost glutation-reduktaze u gujavici *Eisenia andrei*

Nakon 48 h izlaganja selenitu, utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu u skupinama tretiranih selenitom koncentracije 1 i 2.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Slika 13). Aktivnost GR-a je u skupini gujavica tretiranih selenitom 1 $\mu\text{g cm}^{-2}$ iznosila $9.290 \pm 1.999 \text{ U g}^{-1}$ proteina, odnosno u toj skupini zabilježeno je povećanje aktivnosti GR-a od 50.32%. Dok je aktivnost GR-a u skupini gujavica izloženim selenitom 2.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ iznosila 10.196 ± 0.824 , odnosno zabilježeno je povećanje aktivnosti GR-a od 64.98%. Tretman ostalim koncentracijama nije uzrokovao značajne promjene u aktivnosti GR-a, međutim u tim skupinama vidljiv je trend povećanja aktivnosti GR-a.



Slika 13. Aktivnost glutation-reduktaze mjerena u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenita (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,

SI 0.1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita 0.1 $\mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 0.25 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita 0.25 $\mu\text{g cm}^{-2}$,

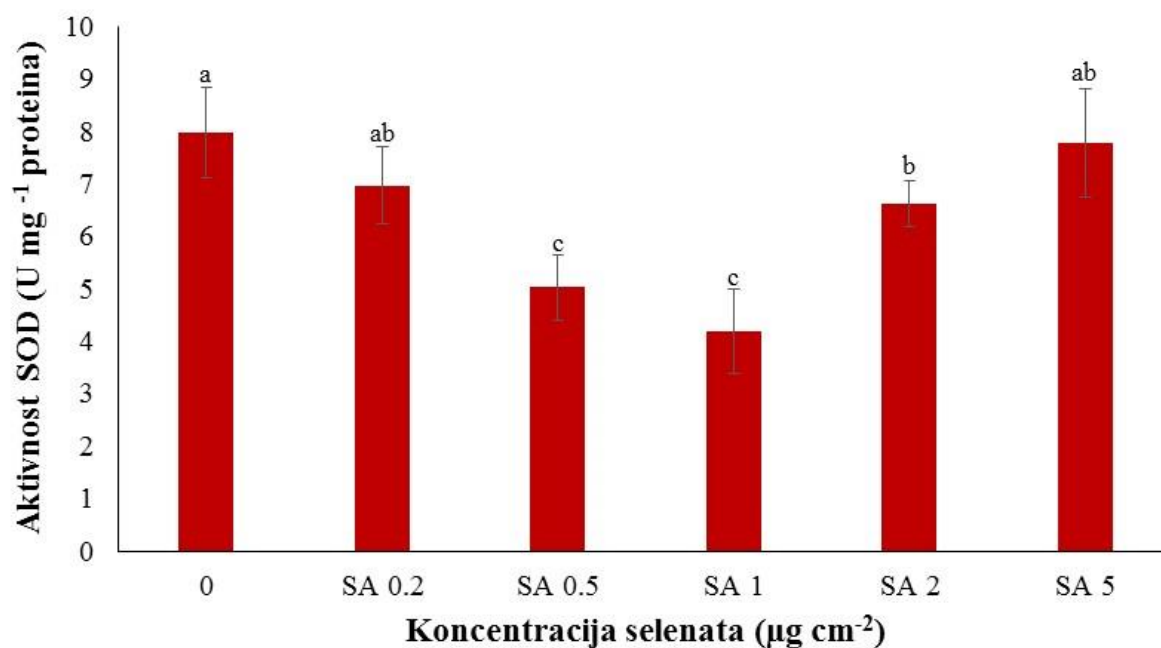
SI 0.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita 0.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita 1 $\mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 2.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita 2.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$.

3.8. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost superoksid-dismutaze u gujavici *Eisenia andrei*

Aktivnost enzima SOD mjerena je 48 h nakon izlaganja gujavica različitim koncentracijama selenata. Korišteno je po 9 gujavica za svaku ispitivanu koncentraciju selenata i kontrolnu skupinu. Tretman gujavica selenatom koncentracija 0.5, 1 i 2 $\mu\text{g cm}^{-2}$ uzrokovao je statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima SOD-a (Slika 14). Izmjerena aktivnosti SOD-a u skupinama sa statističkim značajnim smanjenjem bila je 5.029 ± 0.619 U mg^{-1} proteina (0.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ selenata), 4.185 ± 0.798 U mg^{-1} proteina (1 $\mu\text{g cm}^{-2}$ selenata) i 6.629 ± 0.455 U mg^{-1} proteina (2 $\mu\text{g cm}^{-2}$ selenata). Aktivnost SOD-a se u skupini gujavica tretiranih koncentracijom selenata 0.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ smanjila za 36.94%, smanjenje od 47.53% vidljivo je i u skupini gujavica izloženim selenatu koncentracije 1 $\mu\text{g cm}^{-2}$, dok se u skupini gujavica koje su bile izložene selenatu koncentracije 2 $\mu\text{g cm}^{-2}$, aktivnost SOD-a smanjila za 16.88%. Kod skupina gujavica izloženih selenatu koncentracijama 0.2 i 0.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu.

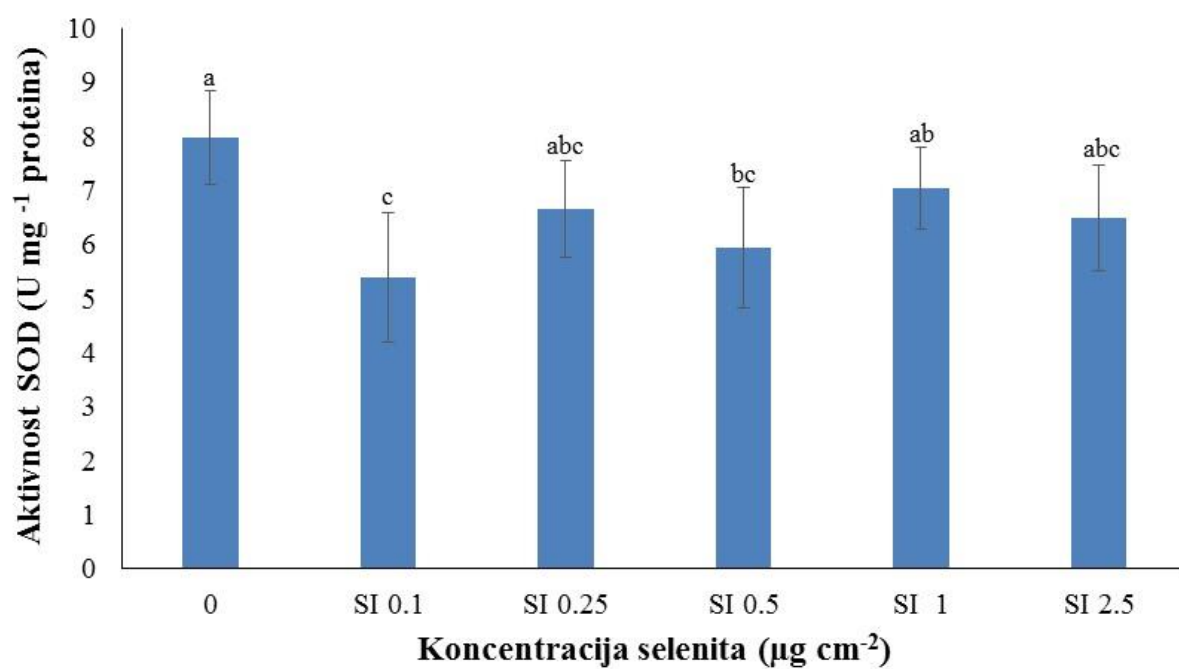


Slika 14. Aktivnost superoksid-dismutaze mjerena u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenata (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,
 SA 0.2 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $0.2 \mu\text{g cm}^{-2}$,
 SA 0.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$,
 SA 1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $1 \mu\text{g cm}^{-2}$,
 SA 2 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $2 \mu\text{g cm}^{-2}$,
 SA 5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenata $5 \mu\text{g cm}^{-2}$.

3.9. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost superoksid-dismutaze u gujavici *Eisenia andrei*

Kako bi se odredila aktivnost SOD-a tretiranih različitim koncentracijama selenita korišteno je 9 gujavica po svakoj skupini. Rezultati mjerenja ukazuju na trend smanjenja aktivnosti SOD-a iako smanjenje nije statistički značajno u svim testiranim skupinama (Slika 15). Izmjerena aktivnost SOD-a bila je u rasponu od 7.975 ± 0.862 U mg^{-1} proteina (kontrola) i 5.396 ± 1.194 U mg^{-1} proteina ($0.1 \mu\text{g cm}^{-2}$ selenita). Statistički značajno smanjenje aktivnosti SOD-a utvrđeno je u skupinama gujavica tretiranih koncentracijama selenita 0.1 i $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$. Aktivnost SOD-a se smanjila u odnosu na kontrolu za 32.34% kod skupine gujavica tretiranih $0.1 \mu\text{g cm}^{-2}$, dok se kod skupine gujavice izložene selenitu koncentracije $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ aktivnost SOD-a smanjila za 25.56%.



Slika 15. Aktivnost superoksid-dismutaze mjerena u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama selenita (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0.05$).

0 – kontrolna skupina gujavica tretirana destiliranom vodom,

SI 0.1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.1 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 0.25 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.25 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 0.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 1 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $1 \mu\text{g cm}^{-2}$,

SI 2.5 – skupina gujavica izlagana koncentraciji selenita $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$.

4. RASPRAVA

Selen je element u tragovima s dva suprotna djelovanja - može djelovati kao esencijalan nutrijent za ljude, životinje i biljke ilipri visokim koncentracijama imati toksično djelovanje na organizme u okolišu. Granica između te dvije funkcije selena je uska i ovisi o kemijskim oblicima selena, koncentraciji i ostalim okolišnim varijablama (Germ i Stibilj, 2007). Niske koncentracije selena pozitivno djeluju na zdravlje ljudi, a dokazano je i njihovo antikancerogeno djelovanje. Međutim, u svijetu postoji problem nedostatka tog mikronutrijenta u tlu, pa tako i u samim biljkama. Vezano uz problem niskih koncentracija selena u zrnu žitarica, često se spominje pojam biofortifikacija selenom, koji se odnosi na povećanje tog elementa u jestivim dijelovima biljke (Eđed, 2011). Rezultat biofortifikacije žitarica selenom upravo je povećanje njegove koncentracije i bioraspoloživosti u zrnu, a samim time i u prehrani ljudi. S obzirom na to da se biofortifikacijom povećava koncentracija selena u biljkama i tlu, izuzetno je važno istražiti kako povećana koncentracija i različiti oblici primjene selena djeluju na organizme koji žive u tlu. Zbog mogućnosti biomagnifikacije selena u hranidbenom lancu (povećanje koncentracije štetnih tvari bioakumuliranih u članovima hranidbenog lanca, proporcionalno s razinom hranidbenog lanca), selen se smatra potencijalno toksičnim elementom za organizme (Wu, 2004). Međutim, istraživanja utjecaja različitih oblika selena na organizme u tlu su vrlo oskudna. Postoji svega nekoliko istraživanja koja se bave tom tematikom, a uključuju gujavice kao modelne organizme. Zbog toga što sulako dostupna vrsta je jednostavna za održavanje i rukovanje prilikom izvođenja eksperimenata, te zbog njegove izuzetne važnosti za strukturu i plodnost tla, gujavice se često koriste u ovakvim ekotoksikološkim istraživanjima (OECD, 1984). Poznato je da je brojnost gujavica u poljoprivrednim tlima mala jer gospodarenje poljoprivrednim zemljištima uključuje procese koji negativno utječu na populacije gujavica (primjerice oranje i primjena pesticida) (Lemtiri i sur., 2014; Gaupp-Berghausen i sur., 2015), te se vrsta gujavice *E. andrei* ne nalazi u poljoprivrednim tlima (Gaupp-Berghausen i sur., 2015; Verrell i Van Buskirk, 2004). Međutim, za ovo istraživanje mehanizama djelovanja selena na gujavice, ova vrsta je zbog svoje produktivnosti, osjetljivosti na promjenjive okolišne čimbenike i jednostavnog rukovanja bila pogodni modelni organizam. Za istraživanje učinaka selena na gujavice koristio se kontaktni filter papir test kao test akutne toksičnosti. Kontaktni filter test je jeftina, jednostavna i brza metoda koja se može koristiti kao „screening“ tehnika za procjenu relativne toksičnosti (Miyazaki i sur., 2002; Grumiaux i sur., 2010). Iako ovaj test

isključuje utjecaj komponenti tla, jednostavnost izvedbi i mogućnost velikog broja ponavljanja eksperimenta omogućuje usporedbu rezultata (Edwards i Bohlen, 1992; Zhang i sur., 2009).

Prvi dio istraživanja uključivao je određivanje mortaliteta gujavica tretiranih selenom u dva oblika - selenatu i selenitu. Rezultati su se prikazali pomoću doza-odgovor krivulja te u obliku srednjih letalnih koncentracija. U prijašnjem istraživanju (Serda i Furst, 1989) odredili su LD₅₀ za selenit i selenat od 31 i 60 mg kg⁻¹ za gujavicu vrste *L. terrestris* te je utvrđeno da je selenit toksičniji od selenata. Ti su rezultati u skladu s rezultatima ovog istraživanja gdje je potvrđeno da je selenit toksičniji za gujavicu *E. andrei* od selenata. Naime, LC₅₀ za selenit je 4.54 µg cm⁻², a za selenat iznosi 22.71 µg cm⁻². Razlika u letalnim dozama utvrđenim u istraživanju Serda i Furst (1989) i ovdje utvrđenim letalnim koncentracijama proizlazi iz drugačijeg načina testiranja toksičnosti. Naime, u ovom istraživanju koristio se kontaktni filter test, dok su Serda i Furst (1989) određivali mortalitet pomoću testa s umjetnim tlom. U sljedećem koraku ovog istraživanja korištene su subletalne koncentracije kako bi se odredio utjecaj selenata i selenita na četiri odabrana biomarkera oksidacijskog stresa: razinu lipidne peroksidacije, omjer GSH/GSSG, aktivnost GR-a i aktivnost SOD-a.

Oksidacijski stres označava poremećaj u ravnoteži između stvaranja ROS-a i antioksidacijske obrane (Betteridge, 2000). Antioksidacijski obrambeni sustav održava ROS pri optimalnim razinama te osim nekih vitamina, koenzima Q odnosno različitih tvari neenzimske prirode, uključuje i široki spektar antioksidacijskih enzima (Birben i sur., 2012). Ukoliko je održavanje ravnoteže između proizvodnje oksidanasa i njihovog uklanjanja narušeno, jedna od posljedica je lipidna peroksidacija, odnosno direktno oštećenje lipida (Ayala i sur., 2014). Odnosno, najbolji pokazatelj da je neko tkivo pod oksidacijskim oštećenjem je povećana količina TBARS-a (Halliwell, 1992; Liu i Mori, 1994). ROS uvelike povećava lipidnu peroksidaciju u organizmima (Esterbauer i Cheesman, 1990) te se u ovom istraživanju povećana razina lipidne peroksidacije kod gujavica tretiranih najvećim testiranim koncentracijama selenata (5 µg cm⁻²) i selenita (2.5 µg cm⁻²) općenito može objasniti povećanim stvaranjem ROS-a u gujavica te smanjenjem aktivnosti pojedinih antioksidacijskih enzima, kao što je SOD. Rezultati pokazuju trend povećanja količine TBARS-a kod gujavica tretiranih selenitom i iako povećanje nije statistički značajno, uočeni trend može ukazivati na povećano stvaranje ROS-a kod gujavica. Veza između lipidne peroksidacije i ROS-a je posebno zanimljiva jer se ROS često nakuplja u stanicama zbog smanjene aktivnosti antioksidacijskih enzima te povećava količinu TBARS-a, dok s druge strane povećana količina TBARS-a dovodi do inaktivacije enzima što opet uzrokuje nakupljanje ROS-a i

poticanje peroksidacije (Wang i sur., 2012). To je potvrđeno i u ovom istraživanju gdje je kod svih skupina gujavica tretiranih selenatom i selenitom bila smanjena aktivnost SOD-a.

Kao ne-enzimski pokazatelj oksidacijskog statusa gujavica tretiranih selenatom i selenitom mjeren je i omjer GSH/GSSG. To je jedan od najčešćih markera stanične redoks ravnoteže. Ova analiza je korisna, jer povećano stvaranje oksidansa rezultira smanjenjem omjera GSH/GSSG (Halliwell i Gutteridge, 2007). U ovom istraživanju gujavice tretirane selenatom nisu pokazale statistički značajne razlike omjera GSH/GSSG u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod gujavica izloženih različitim koncentracijama selenita uočava se statističko značajno povećanje omjera GSH/GSSG kod skupine gujavica tretiranih selenitom koncentracije $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$. Nadalje, i skupina gujavica tretirana selenitom koncentracije $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ pokazuje povećanje u omjeru GSH/GSSG, iako povećanje nije bilo statistički značajno. Razlika u rezultatima omjera GSH/GSSG između selenata i selenita ukazuje na različiti mehanizam djelovanja ova dva oblika selena u gujavica. Uz omjer GSH/GSSG, važno je uzeti u obzir i rezultate mjerenja GR-a. GR je enzim koji je usko vezan uz GSH jer sudjeluje u njegovoj regeneraciji u reducirani oblik uz pomoć NADPH (Deponte, 2013). Kako je GR presudni enzim kod održavanja visokog omjera GSH/GSSG i indikator je redoks stanja u stanicama, promjene u njegovoj aktivnosti mogu uvelike narušiti antioksidacijski kapacitet stanice. U ovom istraživanju izmjerena je povećana aktivnost enzima GR-a. U većini skupina tretiranih selenatom postoji trend povećanja aktivnosti GR-a, iako je statistički značajan porast aktivnosti GR-a samo u skupini s najvećom tretiranom koncentracijom selenata $5 \mu\text{gcm}^{-2}$. Dok su gujavice izložene različitim koncentracijama selenita imale trend povećanja aktivnosti GR-a u svim skupinama, statistički značajan porast aktivnosti izmjeren je na koncentracijama 1 i $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$, te je na koncentraciji $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ aktivnost porasla za 64.98%.

Jedan od važnih antioksidansa je enzim SOD koji sudjeluje u dismutaciji superoksida u vodikov peroksid. Rezultati u ovom istraživanju pokazali su supresiju, odnosno smanjenu aktivnost SOD-a kod gujavica tretiranih selenatom. Trend smanjenja aktivnosti SOD-a bio je vidljiv u svim skupinama tj. testiranim koncentracijama selenata, no statistički značajno smanjenje bilo je utvrđeno kod tri primijenjene koncentracije selenata (0.5 , 1 i $2 \mu\text{g cm}^{-2}$). Slično tome, i kod gujavica tretiranih selenitom utvrđeno je smanjenje aktivnosti SOD-a. Najveće smanjenje aktivnosti SOD-a kod skupine tretirane selenitom bilo je do 32.34%. Iako istraživanja pokazuju da gujavice pod djelovanjem pojedinih ksenobiotika mogu povećati aktivnost SOD-a kako bi se uklonio višak ROS-a u stanicama, neka istraživanja su pokazala da previše ROS-a može uzrokovati inhibiciju aktivnosti enzima (Wang i sur., 2012).

Primjerice utvrđeno je da izlaganje gujavica fluoru uzrokuje smanjenje aktivnosti enzima SOD-a (Lawson i Yu, 2003). Nadalje, istraživanje Luo i sur. (1999) pokazuje da pesticidi mogu uzrokovati supresiju SOD-a kod gujavica.

Očito je da selen dovodi do promjene u oksidacijskom statusu kod gujavica, te su oba oblika selena (selenat i selenit) imali značajne učinke na mjerene biomarkere u gujavici *E. andrei*. Nadalje, postoje određene razlike u mehanizmima djelovanja između ta dva oblika selena što potvrđuju rezultati omjera GSH/GSSG. Međutim, neki odgovori gujavica na tretmane selenatom i selenitom su vrlo slični, primjerice smanjenje aktivnosti enzima SOD-a i povećanje aktivnosti GR-a. U ovom istraživanju nije utvrđen doza ovisan odgovor mjerenih biomarkera na izloženosti selenu, no promjene u sva četiri mjerena biomarkera pokazuju da oksidacijski stres igra važnu ulogu u djelovanju selena na gujavice.

5. ZAKLJUČAK

Kako bi se utvrdilo djelovanje dva oblika selen (selenita i selenata) na gujavice, odnosno organizme u tlu, mjerili su se oksidacijskih biomarkeri - razina lipidne peroksidacije, omjer GSH/GSSG te aktivnosti enzima GR-a i SOD-a. Istraživanje je provedeno na vrsti gujavica *Eisenia andrei* koja je bila izložena različitim koncentracijama selenita i selenata. Ključni zaključci provedenog istraživanja su sljedeći:

1. Određivanjem mortaliteta gujavica, utvrdilo se da je LC_{50} selenita niži od LC_{50} selenata što ukazuje da je selenit toksičniji od selenata.
2. Primjena selenita i selenata uzrokuje značajne promjene u razini lipidne peroksidacije pri najvišim testiranim koncentracijama jednog i drugog oblika selen.
3. Djelovanje selenita i selenata na omjer GSH/GSSG u gujavica je različito što upućuje na različiti mehanizam djelovanja dva oblika selen.
4. Selenit i selenat slično djeluju na SOD i GR. Primjena selenata i selenita smanjuje aktivnost SOD-a, dok povećava aktivnosti GR-a.
5. Izlaganje gujavica selenitu i selenatu uzrokuje promjene u oksidacijskom statusu gujavica.

6. LITERATURA

Ahmad P, Prasad MNV. 2012. *Abiotic stress responses in plants. Plants Metabolism and Sustainability. Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism to Productivity.* Springer (Science+Business Media B.V.), New York. 95 pp.

Aitken RJ, Shaun DR. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 1:15-24.

Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E. 2012. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids-a review. *Environ Exp Bot* 75: 307-324.

Arvy MP. 1993. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 44: 1083-1087.

Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. 2014. Lipid peroxidation:production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxi Med Cell Long* 1-31.

Bafana A, Dutt S, Kumar S, Ahuja PS. 2011. Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Crit Rev Biotechnol* 31:65-76.

Beck MA, Levander O, Handy J. 2003. Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr* 2133:1463-67.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2013. *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb. 1025 pp.

Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3-8.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5 (1):9-19.

Blouin M, Hodson ME, Aranda Delgado E, Baker G, Brussard KR, Butt J, Dai J, Dendooven L, Peres G, Tondoh JE, Cluezeau D, Brun JJ. 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Euro J Soil Sci* 64:161-182.

Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Combs GF. 2001. Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 85: 517-547.

Curtin D, Hanson R, Lindley TN, Butler RC. 2006. Selenium concentration in wheat (*Triticum aestivum*) grain as influenced by method, rate, and timing of sodium selenite application. *New Zealand J Crop Hor Sci* 34:329-339.

Čuvardić MS. 2003. *Selenium in soil. Proceedings for Natural Sciences.* Matica Srpska, Novi Sad 104: 23-37.

Darwin CR., 1881. *The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observations on their habits.* London:John Murray. 326 pp.

Deponte M. 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica Biophysica Acta* 5:3217-3266.

Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch LA, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM. 2006. Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8179-8184.

Dolphin D, Poulson R, Avramović O. 1989. Glutathione: Chemical, biochemical, and medical aspects: John Wiley & Sons Inc., 105:121-126.

Domingez J, Velando A, Ferreira A. 2004. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouche´ (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? *Pedobiol* 49:81-87.

Dumont E, Vanhaecke F, Crnelis R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Anal Bioanal Chem* 385:1304-1323.

Dym O, Eisenberg D. 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* 10:1712-1728.

Eđed A. 2011. Sortna specifičnost akumulacije cinka, kadmija i željeza u zrnu ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.). Doktorski rad. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, Sveučilište u Dubrovniku, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij "Molekularne bioznanosti".

Ebbs S, Leonard W. 2001. Alteration of selenium transport and volatilization in barley (*Hordeum vulgare*) by arsenic. *J Plant Physiol* 158: 1231-1233.

Edwards CA, Bohlen P. 1996. *Biology and ecology of earthworms*. New York: Chapman and Hall. 426 pp.

Ellis DR, Salt DE. 2003. Plants, selenium and human health. *Curr Opin Plant Biol* 6: 273-279.

Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, Wood KV, Harris HH, Pickering IJ, Salt DE. 2004. Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol* 4:1-11.

Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421.

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Commun* 6:67-75.

Ferrari G, Renosto F. 1972. Regulation of sulphate uptake by excised barley roots in the presence of selenate. *Plant Physiol* 49, 114-116.

Flohé L, Otting F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105:93-104.

Fründ HC, Butt K, Capowiez Y, Eisenhauer N, Emmerling C, Ernst G, Potthoff M, Schädler M, Schrader S. 2010. Using earthworms as model organisms in the laboratory: Recommendations for experimental implementations. *Pedobiol* 53: 119-125.

Gärtner R, Gasnier BCH, Dietrich JW, Krebs B, Angstwurm MWA. 2002. Selenium Supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocr Met* 87:1687-1691.

Gaupp-Berghausen M, Hofer M, Rewald B, Zaller JG. 2015. Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Sci Rep* 5:128-186.

Gavrilović B, Matešić D. 1986. Importance of selenium quantity in soil and fodder in regard to some diseases occurring in cattle, pigs, sheep and poultry. In: Combs GF, Spallholz JR, Levander JE, Oldfield O., JE. (eds) , Proc. 3rd Int. Symp. On Selenium in Biology and Medicine, 740-749. Avi Publ Co, Westport, CT, USA.

Germ M, Kreft I, Osvald J. 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol Biochem* 43:445-448.

Germ TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathionemixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382.

Germ M, Stibilj V. 2007. Selenium and plants. *Acta Agri Slo* 89-1; 65-71.

Goven AJ, Venables BJ, Fitzpatrick LC, Cooper EL. 1998. An invertebrate model for analyzing effects of environmental xenobiotics on immunity. *Clin Ecol* 5:150-154.

Gupta M, Gupta S. 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Front Plant Sci* 7:2074.

Habdija I, Habdija BP, Radanović I, Špoljar M, Matoničkin-Kepčija R, Vujčić-Karlo S, Miliša M, Ostojić A, Sertić-Perić M. 2011. *Protista-Protozoa Metazoa-Invertebrata. Strukture i funkcije*. Alfa, Zagreb. 584 pp.

Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59(5):1609-23.

Halliwell B, Gutteridge J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, 704 pp.

Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280:1-8.

Hartikainen H, Xue T, Piironen V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225:193-200.

He PP, Lu XZ, Wang GY. 2004. Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. *Environ Int* 30:167-172.

Hefnawy El Ghany A, Perez Tortora JL. 2010. The importance of selenium and the effect of its deficiency in animal health. *Small Rum Resear* 89:185-192.

ISO 11466. 1994. Soil quality – Extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organization for Standardization, London, UK.

Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC. 1996. Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols-a high-resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Anal Biochem* 241:75-81.

Karplus PA, Schulz GE. 1989. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2Å resolution. *J Mol Biol* 210:163-180.

Kehrer JP, Lund LG. 1994. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17:65-75.

Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect* 106 (7):375-384.

Khan UK, Zuberi A, Nazir S, Ullah I, Jamil Z, Sarwar H. 2017. Synergistic effects of dietary nano selenium and vitamin C on growth, feeding, and physiological parameters of mahseer fish (*Tor putitora*). *Aqua R* 5;70-75.

Kooch Y, Jalilvand H. 2008. Earthworms as ecosystem engineers and the most important detritivores in forest soil. *Pak J Biol Sci* 15; 11(6):819-825.

Kurelec B. 1993. Zablude intuitivne procjene ekološkog rizika. *Encycl Mod* 41:62-67.

Lakin HW. 1972. Selenium accumulation in soils and its absorption by plants and animals. *Bull Geol Soc Am* 83:181-190.

Läuchli A. 1993. Selenium in plants: Uptake, functions, and environmental toxicity. *Bot Acta* 106:455-468.

Lemtiri A, Colinet G, Alabi T, Cluzeau D, Zirbes L, Haubruge E, Francis F. 2014. Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 18(1):122-133.

Li HF, McGrath SP, Zhao FJ. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol* 178:92-102.

Liu J, Luo G, Mu Y. 2012. *Selenoproteins and mimics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 300 pp.

Lončarić Z, Kádár I, Jurković Z, Kovačević V, Popović B, Karalić K. 2012. *Teški metali od polja do stola*. Zbornik radova. 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Opatija, 14-23.

Luperchio S, Tamir S, Tannenbaum SR. 1996. NO-Induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. *Free Radic Biol Med* 21:513-519.

Luo Y, Zang Y, Zhong Y, Kong Z. 1999. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*.. *Chemosphere* 39:2347-2356.

Muth OH, Oldfield JE, Remmert LF. 1957 Effect of selenium and vitamin E on white muscle disease. *Science* 128 (13331): 1090.

Nair S, Singh SV, Krishan A. 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry* 12:336-342.

Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, Shi H, Kryukov GV, Xiang Y, Weeks DP, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 21:3681-3693.

Nuttall KL. 2006. Evaluating selenium poisoning. *Ann Clin Lab Sci* 39:409-420.

Odum EP. 1969. The Strategy of Ecosystem Development. *Science* 164:262-270.

OECD, 1984. Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm Acute Toxicity Tests (Filter Paper Test and Artificial Soil Test). Vol. 207. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.

Phipps GL, Ankley GT, Benoit DA, Mattison VR. 1993. Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants. *Environ Toxicol Chem* 12:269-279.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF. 2010. Selenium metabolism in plants. *Cell Biol Met Nutri* 17:225-241.

Reilly C. 2006. *Selenium in food and health, Vol. 1,2 Introduction, The biology of selenium.* Springer (Science+Business Media), NY, USA:5-26.

Richardson JB, Göres JH, Jackson BP, Friedland AJ. 2015. Trace metals and metalloids in forest soil and exotic earthworms in northern New England, USA. *Soil Biol Biochem* 85:190-198.

Ríos JJ, Blasco B, Cervilla LM. 2009. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Anal Appl Biol* 154:107-116.

Saadatian-Elahi MI, Slimani N, Chajès V, Jenab M, Goudable J, Biessy C, Ferrari P, Byrnes G, Autier P, Peeters PH, Ocké M, Bueno de Mesquita B, Johansson I, Hallmans G, Manjer J, Wirfält E. 2009. Plasma phospholipid fatty acid profiles and their association with food intakes: results from a cross-sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 89 (1):331-46.

Sager M. 2006. Selenium in agriculture, food and nutrition. *Pure Appl Chem* 78:111-133.

Sanchez-Hernandez JC. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev Environ Contam Toxicol* 188:85-126.

Serda S, Furst A. 1987. Acute toxicity of selenium to earthworms. *Poc Western Pharm Soc* 30:277-278.

Shankar AK. 2006. Countering UV-B stress in plants: does selenium have a role? *Plant Soil* 282:21-26.

Sinha RK, Chauhan K, Valani D, Chandran V, Soni BK, Patel V. 2010. Earthworms: Charles Darwin's "unheralded soldiers of mankind": Protective & productive for man & environment. *J Environ Protec* 1:251-260.

Somogy Z, Kádár I, Kiss I, Jurikova T, Szekeres L, Balla Š, Nagy P, Bakonyi G. 2012. Comparative toxicity of selenate and selenite to the potworm *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae) under laboratory conditions. *Eur J Soil Biol* 50:159-164.

Somogyi Z, Kiss I, Kádár I, Bakonyi G. 2007. Toxicity of selenate and selenite to the potworm *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae): a laboratory test. *Ecotox* 16:379-384.

Stenersen J, Brekke E, Engelstad F. 1992. Earthworms for toxicity testing: species differences in response towards cholinesterase inhibiting insecticides. *Soil Biol Biochem* 24:1761-1764.

Svingen BA, O'Neal FO, Aust SD. 1978. The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochem Photobiol* 28:803-809.

Štolfa I, Velki M, Vuković R, Ečimović S, Katanić Z, Lončarić Z. 2017. Effect of different forms of selenium on plant-soil-earthworm system. *J Plant Nutr Soil Sci* 000:1-10.

Štraus B, Barišić K, Čepelak I, Čvorišćec D, Dodig S, Đurić K, Fumić K, Petlevski R, Petrik J, Plavšić F, Plavšić V, Rogić D, Rumora L, Trbojević-Čepe M, Žuntar I, Wolf A. 2005. *Štrausova Medicinska biokemija*. 3. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 655 pp.

Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH. 2008. Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146:1219-1230.

Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS. 2000. Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401-32.

Turakainen M, Hartikainen H, Ekholm P, Seppänen MM. 2006. Distribution of selenium in different biochemical fractions and raw darkening degree of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers supplemented with selenate. *J Agric Food Chem* 54:8617-8622.

Turakainen M, Hartikainen H, Sepänen M. 2004. Effect of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentration of soluble sugars and starch. *J Agric Food Chem* 52:5378-5382.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazir M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149.

Verrell P, Van Buskirk E. 2004. As the worm turns: *Eisenia fetida* avoids soil contaminated by a glyphosate-based herbicide. *Bull. Environm. Contamin. Toxicol.* 72, 219-224.

Wang J, Zhu L, Liu W, Wang J, Xie H. 2012. Biochemical responses of earthworm (*Eiseia foetida*) to the pesticides chlorpyrifos and fenvalerate. *Toxicol Mechan Meth* 22(3): 236-241.

Webb C, Twedt D. 2008. Oxidative stress and liver disease. *Vet Clin Small Anim* 38:125-135.

White PJ, Broadley MR. 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* 182:49-84.

Wu L. 2004. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. *Ecotoxicol Environ Safety* 57, 257-269.

Xue TL, Hartikainen H, Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effects of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil* 237:55-61.

Yang ZP, Dettbarn WD. 1996. Diisopropylphosphorofluoridate-induced cholinergic hyperactivity and lipid peroxidation. *Toxicol Appl Pharmacol* 138:48-53.

Yathavakilla S, Caruso J. 2007. A study of Se–Hg antagonism in *Glycine max* (soybean) roots by size exclusion and reversed phase HPLC–ICPMS. *Anal Bioanal Chem* 389:715-723.

Young IS, McEneny J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29:358-362.

WEB IZVORI:

web 1: <http://www.sciencelearn.org.nz/Science-Stories/Earthworms/Niches-within-earthwormshabitat>, pristupljeno: 1.10.2017

web 2: <http://www.dfarmacia.com/ficheros/images/4/4v25n02/grande/4v25n02-13084477tab01.gif>, pristupljeno: 14.10. 2017

web 3: http://www.recyclaqua.agropolis.fr/dossier_presse/images/photo09.jpg, pristupljeno: 1.10.2017