

UTJECAJ PREOPTEREĆENJA ŽELJEZOM NA KONCENTRACIJU CINKA I BAKRA U MOZGU ŠTAKORA U MODELU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNOSNOG ENCEFALOMIJELITISA

Fučak, Tedi

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:000979>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Tedi Fućak

UTJECAJ PREOPTEREĆENJA ŽELJEZOM NA KONCENTRACIJU CINKA I
BAKRA U MOZGU ŠTAKORA U MODELU EKSPERIMENTALNOG
AUTOIMUNOSNOG ENCEFALOMIJELITISA

Završni rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Tedi Fućak

UTJECAJ PREOPTEREĆENJA ŽELJEZOM NA KONCENTRACIJU CINKA I BAKRA
U MOZGU ŠTAKORA U MODELU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNOSNOG
ENCEFALOMIJELITISA

Završni rad

Rijeka, 2015.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Marin Tota

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Dalibor Broznić (predsjednik komisije)
2. doc.dr.sc. Dijana Detel
3. izv.prof.dr.sc. Marin Tota

Rad ima 48 stranica, 15 slika, 3 tablice, 59 literaturnih navoda.

Završni rad je izrađen na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marina Tota, najvećim dijelom na Zavodu za Kemiju i biokemiju uz suradnju Zavoda za fiziologiju i imunologiju, a dijelom u laboratoriju za kontrolu kvalitete, Rafinerije nafte Rijeka - INA d. d. u Kostreni na Urinju.

Ovim putem se prvenstveno zahvaljujem svom mentoru završnoga rada izv. prof. dr. sc. Marinu Tota sa Zavoda za Kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci, na iskazanom velikom strpljenju i razumijevanju, pruženoj literaturi te uloženom trudu, pomoći i korisnim savjetima, što mi je omogućilo izvršavanje praktičnog i eksperimentalnog, te svih sastavnica teorijskog dijela završnoga rada.

Zahvaljujem se Ogrizović Roberti, bacc.med.lab.diagn., višoj tehničarki sa Zavoda za Kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci, na strpljenju, uloženom trudu i vremenu, pomoći, te korisnim savjetima tijekom rada u laboratoriju za izvršenje praktičnog dijela završnoga rada.

Zahvaljujem se Zlatku Ciganj, dipl. inž. iz Laboratorija za kontrolu kvalitete, Rafinerije nafte Rijeka - INA d. d. na razumijevanju i pruženoj mogućnosti prisustvovanja u laboratoriju za kontrolu kvalitete, Rafinerije nafte Rijeka - INA d. d. u Kostreni na Urinju tijekom standardne procedure u analizi metala, ICP-OES metodom.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj potpori.

SAŽETAK

Željezo, bakar i cink predstavljaju esencijalne nutrijente, odnosno kationske elemente u tragovima. Oni se prenose specifičnim nosačima preko staničnih membrana, te u reakcijama sudjeluju kao anorganski ioni. Svaki od ovih elemenata ima svoju specifičnu funkciju i metaboličku regulaciju. Uloga cinka i bakra, na razini staničnog metabolizma je od posebnog značaja u prvom redu zbog toga jer stotine danas poznatih enzima zahtjeva te metale za svoju katalitičku aktivnost. Bakar i željezo, zbog mogućnosti prijenosa elektrona predstavljaju osnovu oksidacijsko-redukcijskih procesa, kao što su primjerice procesi respiracije. Navedeni metali također mogu biti i toksični u slučajevima ako njihova razina i distribucija u organizmu nije pažljivo regulirana, stoga pojedinačne smanjene ili povišene vrijednosti ovih elemenata u tragovima mogu dovesti do razvoja određenih patoloških stanja. Preopterećenje željezom može uzrokovati oksidacijski stres, tvorbom slobodnih radikala. Pogreške u metabolizmu bakra, cinka i željeza odnose se na njihove poremećaje u transportu preko membrana i unutar stanice, što može biti posljedica međusobnih i nepoželjnih interakcija u slučajevima patoloških promjena njihovih koncentracija u organizmu. Svrha ovoga rada je pokazati kako preopterećenje željezom, odnosno stanje povećanog unos željeza djeluje na promjenu koncentracije elemenata bakra i cinka u mozgu kod štakora u modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE), koji predstavlja animalni model za autoimunu i demijelinizacijsku, neurodegenerativnu bolest kod ljudi, multiplu sklerozu (MP). U eksperimentu su korišteni Dark Agouti (DA) štakori muškoga spola, koji su podjeljeni u tri skupine: eksperimentalnu skupinu, željezo preopterećenih, kontrolnu skupinu tretiranu fiziološkom otopinom i netretiranu skupinu. Kako bi se koncentracija metala mogla izmjeriti, uzorci moždanog tkiva su obrađeni postupkom mikrovalne digestije. Koncentracije cinka i bakra u moždanom tkivu su određene primjenom ICP-OES metode na Prodigy High Dispersion ICP-OES spektrofotometru s pneumatskim raspršivačem. Prosječne vrijednosti

izmjerenih koncentracija cinka u moždanom tkivu štakora u modelu EAE se ne razlikuju statistički značajno kod eksperimentalne skupine (tretirane željezom) u odnosu na kontrolnu skupinu (tretiranu fiziološkom otopinom) i netretiranu skupinu štakora, dok je kod prosječnih vrijednosti izmjerenih koncentracija bakra u moždanom tkivu štakora pronađena statistički značajna razlika kod eksperimentalne skupine u odnosu na kontrolnu i netretiranu skupinu štakora, gdje je izračunata prosječna vrijednost koncentracija bakra bila statistički značajno povećana.

ključne riječi: **željezo, bakar, cink, preopterećenje željezom, oksidacijski stres, eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis, ICP-OES**

SUMMARY

Iron, copper and zinc are essential nutrients, or cationic trace elements. They are transferred by specific carriers across cell membranes, and they are involved in the reactions, as inorganic ions. Each of these elements has a specific function and metabolic regulation. The role of zinc and copper, at the level of cellular metabolism is of particular importance in the first place, because hundreds of known enzymes request these metals for its catalytic activity. Copper and iron, because of their possibility of electron transfer, are basis of oxidation-reduction processes, such as respiration processes. These metals can also be toxic in case if their levels and distribution in organism isn't carefully regulated, so individually decreased or increased values of these trace elements can lead to development of certain pathological conditions. Iron overload can cause oxidative stress, through formation of free radicals. Defects in the metabolism of copper, zinc and iron are related to their disorders in transport across the membrane and within the cell, which may be the result of mutual and undesirable interaction in cases of pathological changes of their concentration in the body. The aim of this study is to show how iron overload, or condition of increased intake of iron affects the change in concentration of the elements copper and zinc in the brain of the rats in the model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which is an animal model for autoimmune and demyelination, neurodegenerative disease in humans, multiple sclerosis (MP). Dark Agouti (DA) male rats were used in this experiment and they were divided into three groups: experimental group (iron overloaded), the control group (treated with saline solution) and the untreated group. To be able to measure the concentration of metals, samples of brain tissue were processed using microwave digestion. The concentrations of zinc and copper in the brain tissue were determined using ICP-OES methods on Prodigy High Dispersion ICP-OES spectrophotometer with pneumatic nebulizer. Average values of the measured concentrations of zinc in the brain tissue of rats in a model of EAE is not

statistically significant different in the experimental group compared to the control and untreated group of rats, while average values of the measured copper concentration varied in the brain tissue of rats. Statistically significant increase was found in the experimental group compared to the control group and the untreated rats.

key words: **iron, copper, zinc, iron overload, oxidative stress, experimental autoimmune encephalomyelitis, ICP-OES**

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1. 1. Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis	1
1. 2. Željezo	3
1. 2. 1. Preopterećenje željezom i oksidacijski stres	4
1. 2. 2. Homeostaza željeza i metabolizam u mozgu	7
1. 3. Bakar	9
1. 3. 1. Uloga bakra u organizmu	9
1. 3. 2. Homeostaza bakra i metabolizam u mozgu	11
1. 4. Cink	13
1. 4. 1. Uloga cinka u organizmu	13
1. 4. 2. Homeostaza cinka i metabolizam u mozgu	15
1. 5. Međudjelovanje željeza s bakrom i cinkom	16
1. 6. Induktivno spregnuta plazma vezana s optičkom spektrofotometrijom (ICP-OES)	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	23
3. MATERIJALI I METODE	24
3. 1. Plan pokusa	24
3. 2. Eksperimentalne životinje	25
3. 3. Uzorci tkiva	25
3. 4. Priprava uzoraka i određivanje koncentracije cinka i bakra u tkivu mozga ICP-OES metodom	26

3. 5. Statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI	29
4. 1. Koncentracija cinka (Zn) u mozgu štakora nakon preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)	29
4. 1. 1. Usporedba prema kontrolnoj skupini - cink	30
4. 1. 2. Usporedba prema netretiranoj skupini - cink	31
4. 1. 3. Skupni prikaz promjena koncentracije cinka (Zn) u mozgu štakora u modelu EAE	32
4. 2. Koncentracija bakra (Cu) u mozgu štakora nakon preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)	33
4. 2. 1. Usporedba prema kontrolnoj skupini - bakar	34
4. 2. 2. Usporedba prema netretiranoj skupini - bakar	35
4. 2. 3. Skupni prikaz promjena koncentracije bakra (Cu) u mozgu štakora u modelu EAE	36
5. RASPRAVA	37
5. 1. Utjecaj preopterećenja željezom na koncentraciju cinka u mozgu štakora u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)	37
5. 2. Utjecaj preopterećenja željezom na koncentraciju bakra u mozgu štakora u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)	39
6. ZAKLJUČCI	42
7. LITERATURA	43
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1. 1. Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis

Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis (EAE) je CD4⁺ T stanicama posredovana autoimuna bolest, s demijelinizacijom i upalom živčanog sustava, te s posljedičnom progresivnom paralizom ekstremiteta, a inducirana je imunizacijom u osjetljivih sojeva štakora ili miševa sa mijelinskim antigenima (uglavnom mijelin bazičnim proteinom) u kombinaciji s adjuvantima. EAE je kompleksno stanje, opisano interakcijama između različitih mehanizama imunopatofiziologije i neuropatofiziologije, te predstavlja dobar model za istraživanje mehanizama neuropatogeneze i imunološke regulacije, a općenito se smatra da je kao animalni model, EAE najrelevantniji za ljude u proučavanju imunološki posredovane demijelinizacijske bolesti, koja se naziva multipla skleroza (MS) ili akutnog diseminiranog encefalomijelitisa (ADEM)[1-3]. Multipla skleroza je kronična autoimuna bolest središnjeg živčanog sustava, koja dovodi do nastanka upale, demijelinizacije i gubitka aksona[4]. Tijekom patološkog procesa MS i EAE, imunološka ravnoteža in vivo je poremećena zbog Th-1 posredovanog imunološkog odgovora. MBP (mijelin bazični protein) specifične, autoimuno reaktivne Th-1 stanice su prisutne u krvi, organima imunološkog i središnjeg živčanog sustava. One proizvode i izlučuju brojne imunološke molekule (kao što su: proupalni citokini, adhezijske molekule i kemokini), a uništavaju krvno-moždanu barijeru, te induciraju apoptozu oligodendrocita i uzrokuju gubitak snopova oko živčanih aksona. TNF- α i IFN- γ su važni citokini, koje Th-1 stanice izlučuju i povišeni su u serumu kod MS i EAE, te imaju ulogu u demijelinizaciji[5]. Posljednjih godina postalo je jasno da EAE nije savršen model za sve aspekte multiple skleroze. Neki modeli su bolji za imunološka istraživanja, a neki za istraživanje pojedinih aspekata neurobioloških bolesti, kao primjerice patofiziologije aksona i neurona. Znanstvena istraživanja, koja se baziraju na modelu EAE moraju uključivati odabir pravilne vrste EAE i imunizacijskog protokola, jer se ovisno o tim

faktorima, ishodi istraživanja razlikuju. Modeli EAE, koji se koriste u svrhu laboratorijskog istraživanja imunoloških i neurobioloških mehanizama bolesti, te moguće primjene terapije, su inducirani ili genetički modificirani modeli. EAE se može inducirati u životinja različitih karakteristika i vrsta, no za tu svrhu se najčešće koriste miševi i štakori, a kao neki od razloga zašto se oni najviše koriste možemo istaknuti: njihovu relativno malu veličinu, dostupnost uzgojenih sojeva, mogućnost genetske modifikacije, te pristupačnost ogromnog broja alata za karakterizaciju glodavaca[4]. Najčešće korišteni antigeni za indukciju EAE kod glodavaca su: homogenat leđne moždine (SCH), pročišćeni mijelin, mijelinski proteini, kao što su: MBP (mijelin bazični protein), PLP (mijelin proteolipid protein) i MOG (mijelin oligodendrocit glikoprotein), te peptidi tih proteina, a kao rezultat se vidi razvijanje i nastanak posebnih modela različitih stanja bolesti. EAE se također može inducirati i s pasivnim prijenosom T-stanica, reagirajući, specifično s mijelin-antigenima. Ovisno o antigenu, koji se koristi, te genetski modificiranoj životinji (glodavcu), može se razviti monofazni, relaps-remitirajući ili kronični oblik EAE[3]. Danas široko korišteni EAE modeli su: monofazni EAE kod LEW štakora, koji je induciran sa mijelin bazičnim proteinom (MBP) ili MBP peptidima, te kompletnim oblikom Freundovog adjuvanta (CFA)[4]. Freundov adjuvant je otopina antigena, emulgirana u mineralnom ulju, a koristi se za pojačavanje imunološke reakcije. Kompletan oblik, Freund-ov potpuni adjuvant (CFA) se sastoji od inaktiviranih i osušenih mikobakterija (obično *M. tuberculosis*), dok nepotpunom obliku (IFA) nedostaju te bakterijske komponente[6]. Kao prototip kroničnog oblika EAE modela kod štakora, EAE induciran u Dark Agouti (DA) štakora cijelim ekstraktom mijelina s IFA ili izvanstaničnom domenom mijelinskim oligodendrocitnim glikoproteinima (MOG) s CFA ili IFA, ima visoku vrijednost za istraživanja o biologiji bolesti multiple skleroze i terapijske intervencije. Cijeli ekstrakt mijelina za ovaj model se obično dobiva iz autologne leđne moždine DA štakora. U miševa, model, koji se najviše koristi je model kroničnog oblika u C57BL / 6 miševa induciran s

izvanstaničnom domenom MOG ili MOG peptida 35-55 kao i preko CFA, te pertusis toksina (PT) kao adjuvanta[4]. Kod multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa, pozitivne reakcije željeza su zabilježene u odjeljcima okolnih demijeliniziranih plakova, zatim u mijeliniziranoj bijeloj tvari, te unutar krvnih žila sive tvari okolnih lezija, što znači da je slobodno ili labavo vezano željezo promicanjem oksidacijskog oštećenja tkiva, pridonijelo patogenezi neuroloških bolesti. Kako auto-agresivne CD4⁺ T stanice, također koriste željezo za normalni razvoj i metabolizam, istaknuto je da nedostatak željeza može pružiti zaštitu od razvoja EAE, što stoga pokazuje da različit status željeza može različito utjecati na dinamiku autoimune bolesti[7].

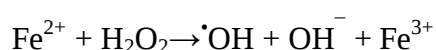
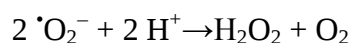
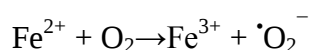
1. 2. Željezo

Željezo je poznati mineralni element u tragovima, te kao takav iako čini puno manji postotak mase tijela, on je od vitalnog značaja za pravilno funkcioniranje organizma. U organizmu mora biti prisutan u odgovarajućoj količini, te mora biti na raspolaganju za važne kemijske reakcije sa drugim elementima[8]. Željezo je 26. element periodnog sustava elemenata ($A_r = 55,85$), te se pojavljuje u dva oksidacijska stanja fero (Fe^{2+}) i feri (Fe^{3+}), što mu daje mogućnost da sudjeluje u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama, važnim za energetske procese, u vidu otpuštanja i primanja elektrona. Međutim, ovo svojstvo omogućuje slobodnom željezu katalizirati reakcije oksidacije, što rezultira nastajanjem reaktivnih i štetnih slobodnih radikala, te je željezo u takvim slučajevima toksično, kada je prisutno u visokim koncentracijama[9-11]. Zbog navedenog, željezo u organizmu mora biti kemijski vezano, kako bi se odvijala odgovarajuća fiziološka funkcija, transport i skladištenje sa minimalnom mogućnošću slobodnog ionskog željeza da katalizira štetne reakcije oksidacije.

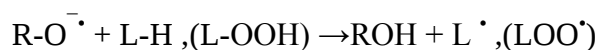
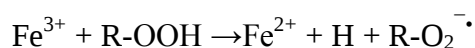
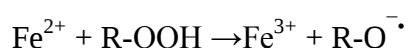
1. 2. 1. Preopterećenje željezom i oksidacijski stres

Većina funkcija željeza u tijelu se odnosi na onaj u hemu, koji u svojoj strukturi sadrži željezo i ima ulogu u transportu kisika kod hemoglobina i mioglobina. Osim hemoglobina i mioglobina još neki važni proteini u organizmu sadrže hem, uključujući citokrome, koji su važni za proizvodnju i stvaranje energije[10,11]. Određeni udio željeza u organizmu u obliku hema sadrži vodik, kao što su enzimi, peroksidaza i katalaza, koji štite od prekomjernog nakupljanja vodikovog peroksida, katalizirajući njegovo prevođenje u vodik i kisik. Željezo se također nalazi u obliku nehemskih proteina, koji sadrže željezo-sumpor centre, što predstavlja glavnu formu željeza u mitohondrijima, i funkcionalnim enzimima u proizvodnji energije, kao što su: akonitaza, NADH-dehidrogenaza i sukcinat-dehidrogenaza[10-14]. Optimalna koncentracija željeza, doprinosi fiziološkoj ravnoteži organizma, no u slučajevima nefiziološke, neprikladne i povećane akumulacije intracelularnog željeza u mozgu, željezo postaje neurotoksično, zbog svoje mogućnosti da u aerobnim uvjetima katalizira propagaciju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), odnosno proizvodnju visoko reaktivnih slobodnih radikala (kao što su hidroksilni, peroksilni, alkoksilni radikali)[15-17]. Slobodni radikali se definiraju kao molekule ili njezini dijelovi, koje u svojoj strukturi imaju nespareni elektron u vanjskoj elektronskoj orbitali, zbog čega vrlo brzo ulaze u kemijske reakcije sa raznolikom skupinom molekula. Reagiranjem sa raznim molekulama nastaju neenzimske lančane reakcije, jer produkti isto imaju karakteristike radikala[18]. Nastali reaktivni kisikovi spojevi (ROS) mogu oštetiti stanične makromolekule, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline, no pod normalnim uvjetima, detoksikacijski sustavi i antioksidativni mehanizmi obrane štite organizam od djelovanja slobodnih radikala, tako primjerice katalaza i glutation-peroksidaza brzo pretvaraju H_2O_2 u vodu, održavajući ROS induciranu štetu u mozgu na minimalnoj razini[13]. U slučajevima kada količina ROS nadilazi stanične sustave detoksikacije i antioksidativne mehanizme obrane, dolazi do nastanka oksidacijskog stresa.

Istovremeno dolazi do mogućeg oštećenja brojnih proteina kao što su: Ca^{2+} -ATP-aza, transporter glutamata, K^+/Na^+ -ATP-aza i N-metil-D-aspartat (NDMA) receptor, a s druge strane ROS uzrokuju oksidaciju lipida npr. kolesterola, ceramida i sifinogmijelina. Oksidacijom lipida dolazi do sinaptičke disfunkcije i stanične smrti neurona[15,16,18]. Stoga nije iznenađujuće da je povećana koncentracija željeza prisutna u nekim neurodegenerativnim bolestima, primjerice Alzheimerovoj i Parkinsonovoj bolesti[15,16,19]. Moguće posljedice reakcije radikala i staničnih makromolekula navedene su u tablici 1. Željezo-inducirani oksidacijski stres je opasan, jer može uzrokovati dodatno otpuštanje željeza iz željezo-vezujućih proteina kao što su: feritin (Ft) i hem-proteini, te željezo-sumpor centara, pojačavajući tako toksičan efekt preopterećenosti mozga željezom[16,18,20]. Željezo katalizira stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, te inicira i propagira peroksidaciju lipida, reagirajući s vodikovim peroksidom (H_2O_2) u Fentonovoj reakciji. ROS su visoko reaktivni kisikovi radikali, koji lako reagiraju s drugim molekulama, proteinima, s DNA, te lipidima i antioksidansima[18,19].



Željezo također može reagirati s lipidnim peroksidima na način sličan reakciji s H_2O_2 pri čemu nastaju alkoksilni ($\text{R-O}\cdot$) i peroksilni radikali ($\text{R-O}_2\cdot$). Nastali peroksilni radikali provode propagaciju peroksidacije lipida. Lipidna (L) peroksidacija se može provoditi kako lipidni radikali međusobno reagiraju, sve dok se lančana reakcija ne zaustavi reakcijom radikala s nekim antioksidansom, npr. vitaminom E, tvoreći manje reaktivne spojeve[19].



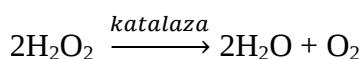
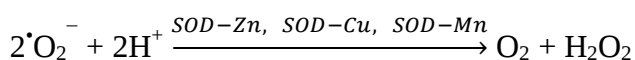
Mehanizmi patogeneze, koji uključuju slobodne radikale, imaju veliki doprinos u progresivnom smanjenju fizioloških funkcija organizma.

Tablica 1. Ishodi djelovanja slobodnih radikala na stanične makromolekule u organizmu.

Tablica je uređena prema [18]

Stanična makromolekula	Djelovanje slobodnog radikala	Ishod reakcije u stanici
lipidi	lipidna peroksidacija	-povećana permeabilnost membrane zbog perforacije
		-stanična smrt
proteini	karbonilacija	-nakupljanje peroksidiranih lipida u procesu starenja (lipofuscin)
		-skraćen poluvijek staničnih molekula, zbog ubrzanog katabolizma proteina
		-smanjena enzimatska aktivnost
DNA	mutacije	-promjene antigeničnosti molekula
		-promjene u ekspresiji gena
		-gubitak heterozigotnosti

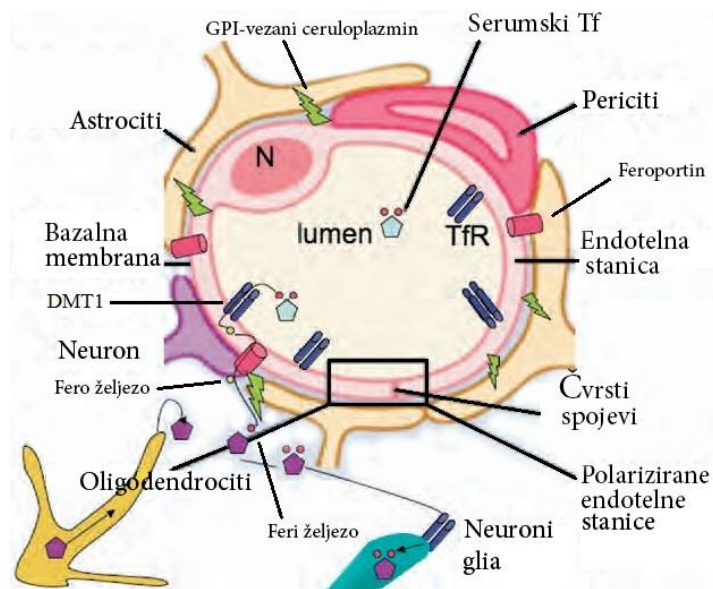
Stanice organizama imaju mehanizme regulacije količine slobodnih radikala na fiziološkoj razini u vidu reakcije radikala s ligandima (malim molekulama, antioksidansima) i u vidu djelovanja preko enzimskih reakcija (superoksid-dismutaza, katalaza). U prirodne antioksidanse ubrajaju se vitamini C i E, koenzim Q, tiolne molekule (primjerice: cistein, metionin, glutation), zatim i ubikinon, melatonin, itd. Visoko reaktivni slobodni radikali se u enzimskim reakcijama prevode u manje reaktivne, tako i manje toksične, odnosno netoksične spojeve. Superoksid-dismutaza (SOD) je metaloenzim, koji u katalitičkom središtu sadrži metal, pa tako SOD u mitohondrijima sadrži mangan (Mn), dok citoplazmatska SOD, cink (Zn) ili bakar (Cu). SOD ima funkciju u prevođenju $\cdot\text{O}_2^-$ u manje reaktivan H_2O_2 , a katalaza prevodi H_2O_2 u vodu i jednu molekulu kisika[18]:



1. 2. 2. Homeostaza željeza i metabolizam u mozgu

Ukupna količina željeza u organizmu je regulirana na razini apsorpcije željeza u gastrointestinalnom traktu, a regulacija obuhvaća seriju molekularnih interakcija proteina, koji uključuju produkt hemokromatoza (HFE) gena, transferin (Tf), transferin receptor (TfR) i željezo regulatorne proteine (IRPs) u Lieberkühn kriptama, kojima se utvrđuje dopuštena količina željeza, koja prolazi enterocyte i ulazi u krvni optok. HFE, Tf i TfR međusobno integriraju, dok IRP reagira sa mRNA transferin-receptora i feritina[21]. Novije identificirani antimikrobni peptid, hepcidin, u krvi i urinu, vjerojatno služi kao signal za smanjenje apsorpcije željeza. Produkt hemokromatoza (HFE) gena, HFE protein, lociran je na bazolateralnoj membrani crijeva, a utječe na unos željeza u plazmu putem transferina. Transferin u plazmi prenosi željezo stanicama, povezujući se visokim afinitetom s plazma membranskim proteinom, transferin-receptorom 1 (TfR1)[11,22]. Stanice dobivaju željezo iz seruma, ekspresijom transferin-receptora 1, koji veže željezo-vezani Tf i nastaje internalizirani Tf-TfR kompleks u endosomima, a endosomalnom reduktazom nastaje fero željezo, koje se prenosi u citosol preko endosomalnog transportera dvovalentnih metala (DMT1)[16,22]. Barijera koja odvaja CNS od sistemske cirkulacije poznata je kao krvno-moždana barijera. Apsorpcija željeza u mozgu je posredovana endotelnom TfR ekspresijom u krvno-moždanoj barijeri[15,16]. Slika 1. prikazuje proces apsorpcije željeza, te građu krvno-moždane barijere, koja je sastavljena od endotelnih stanica, udruženih čvrstim vezama i okruženih bazalnom membranom, a ona sadrži pericite, dok se u uskom okruženju nalaze nastavci astrocita s krajnjim pločastim proširenjima (stopala astrocita). Kako su unutar CNS-a, endotelne stanice čvrsto povezane, tvari, koje ulaze u CNS moraju koristiti poseban endotelni transportni sustav. Prvi korak ulaska željeza u CNS, posredovan je TfR1, koji je izražen na luminalnoj membrani endotelnih stanica, koje imaju jezgru (nucleus) i koje vjerojatno ekspimiraju feroportin. Transferin-vezano željezo ulazi u središnji živčani sustav,

a unos željeza iz endosoma ovisi o DMT1. Stopala astrocita eksprimiraju poseban oblik feroksidaze, tj. ceruloplazmin, koji je vezan na membranu preko veze s GPI (glikozil-fosfatidil-inozitol). Unos transferina (Tf) u endotelne stanice kapilara mozga, prati mehanizam endocitoze, gdje se cirkulirajući Tf veže na Tf receptore, te dolazi do internalizacije. Tijekom endocitoze Tf-TfR kompleksa, feri željezo se reducira u fero željezo, a zatim se izvozi u citosol, najvjerojatnije preko DMT1, te kasnije izvozi iz stanice, vjerojatno pomoću ferroportina. Unutar citosola, u intersticiju mozga se GPI-vezanim ceruloplazminom oksidira u feri željezo[11,16,22]. Tf sintetiziraju i izlučuju uglavnom oligodendrociti, stanice koje obrađuju mijelinske korice oko aksona, a Tf prenosi željezo kroz CNS. Transferin veže feri željezo, te tako neuroni dobivaju željezo ekspresijom TfR. Jednom kad se željezo nađe unutar citosola endotelne stanice, može biti eksportiran preko ferroportina iz krvno-moždane barijere[11,15,16,22]



Slika 1. Apsorpcija željeza iz sistemske cirkulacije kroz krvno-moždanu barijeru. Slika je uređena prema [22]

1. 3. Bakar

Bakar predstavlja jedan od najduže poznatih elemenata [23]. Esencijalni je mikronutrijent, potreban za rast i razvoj, te fiziološko funkcioniranje svih živih organizama[23-34]. Bakar je kemijski element u periodnom sustavu elemenata sa simbolom Cu (skraćenica od latinske riječi cuprum) s atomskim brojem 29 i s atomskom masom 63,546[23,25]. Promjene koncentracije bakra u tjelesnim tekućinama i tkivima, koje su posljedica poremećaja metabolizma bakra u organizmu, mogu uzrokovati različite bolesti. Bakar kao element u tragovima, zastupljen je gotovo u svakoj stanici organizma[29].

1. 3. 1. Uloga bakra u organizmu

Kao prijelazni metal, bakar ima posebno važnu ulogu u aerobnoj fiziologiji organizma, jer može biti i donor i akceptor elektrona, te je tako esencijalan element u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama stanice. Bakar nalazimo u dva različita redoks oblika: oksidirani Cu(II) i reducirani Cu(I). Uključen je u različite biološke procese, gdje djeluje kao važan katalitički kofaktor za raznovrsne metaboličke reakcije, odnosno omogućuje pravilno funkcioniranje mnogih enzima. Međutim, tijekom tih istih reakcija esencijalnih za aerobni metabolizam, mogu nastati toksični reaktivni kisikovi spojevi[10,26,32,33]. Bakar se tako može ponašati i kao antioksidans i kao prooksidans. Kao antioksidans, bakar neutralizira djelovanje slobodnih radikala i može smanjiti posljedice ili prevenirati poremećaje, koje bi izazvali. Kada se ponaša kao prooksidans, s vremenom pojačava štetu nastalu djelovanjem slobodnih radikala i može doprinjeti razvoju Alzheimerove bolesti. Također, poznate su još mnoge važne uloge bakra u stanici i fiziološkim procesima kao što su: stanično disanje, metabolizam željeza, biosinteza neurotransmitera, detoksikacija slobodnih radikala, razvoj embrija, produkcija mijelina, melanina, održavanje funkcije hepatocita, neurona, te je esencijalan u očuvanju čvrstoće kože, krvnih žila, epitelnog i vezivnog tkiva u cijelom

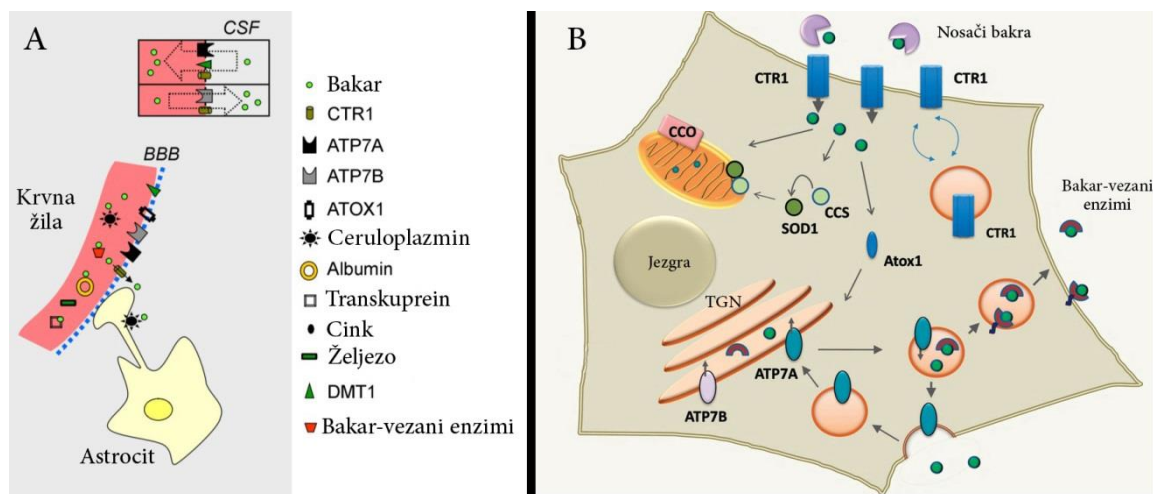
tijelu[26,28,31]. Bakar je funkcionalna komponenta, odnosno kofaktor za aktivnost mnogih esencijalnih enzima, među koje ubrajamo: citokrom-c-oksidadu, lizil-oksidadu, ceruloplazmin, dopamin-beta-monooksigenazu ili dopamin-beta-hidroksilazu, tirozinazu, superoksid-dismutazu (SOD) i još puno drugih. Citokrom-oksidadu ima esencijalnu ulogu u proizvodnji stanične energije jer katalizira redukciju molekularnog kisika u vodu. Citokrom-c-oksidadu stvara električki gradijent, koji koriste mitohondriji u proizvodnji vitalne energije za organizam i skladište je u obliku ATP molekula. Lizil-oksidadu ima ulogu u poprečnom povezivanju kolagena i elastina, koji formiraju vezivno tkivo. Učinak lizil-oksidade pomaže održati integritet i elastičnost vezivnog tkiva u srcu i krvnim žilama, ali također ima ulogu u formaciji kosti. Ceruloplazmin (ferooksidadu) oksidira fero željezo (Fe^{2+}) u feri željezo (Fe^{3+}), koji se onda veže na transferin za prijenos putem krvi. Ceruloplazmin može imati funkciju antioksidansa, jer olakšava vezanje željeza i degradaciju transferina, a tako može spriječiti stvaranje štetnih radikala putem slobodnih iona željeza (Fe^{2+}). Mnoge enzimске reakcije, koje su esencijalne za pravilno funkcioniranje mozga su katalizirane bakar-vezujućim enzimima. Dopamin-beta-monooksidadu katalizira pretvorbu neurotransmitera dopamina u noradrenalin. Mijelinska ovojnica je napravljena od fosfolipida, čija sinteza ovisi o aktivnosti bakar-ovisne citokrom-c-oksidade. Bakar vezujući enzim tirozinazu je potreban za stvaranje pigmenta melanina. Melanin proizvode melanociti, a ima ulogu u pigmentaciji kose, kože i očiju. Superoksid-dismutazu djeluje kao antioksidans, katalizirajući pretvorbu superoksidnog radikala u vodikov peroksid, koji se zatim može reducirati u vodu, preko drugih antioksidativnih enzima. Dva oblika superoksid dismutaze sadrže bakar: 1) bakar/cink SOD je prisutan u većini stanica, uključujući eritrocite i 2) izvanstanični SOD, lokaliziran u velikoj mjeri u plućima, a u nižoj količini u plazmi. Bakar-ovisni enzimi su uključeni u regulaciju ekspresije gena, te tako mogu utjecati, ovisno o razini bakra na sintezu proteina, pojačavajući ili inhibirajući transkripciju specifičnih gena, a u tu skupinu enzima spadaju bakar/cink

superoksid-dismutaza i katalaza[10,29,31]. U mozgu, bakar je u pravilnim i u određenim koncentracijama važan za njegov normalan razvoj, tako da i manjak bakra kao i njegova prevelika koncentracija, može ozbiljno oštetiti funkcije mozga. Mozak posjeduje mehanizme regulacije metabolizma bakra, kako ne bi došlo do takvih poremećaja. Poremećaj homeostaze bakra u mozgu povezuje se sa nekim neurodegenerativnim bolestima u ljudi, kao što su: Menkesova bolest, Wilsonova bolest i Alzheimerova bolest[32,35]. Zbog svega navedenog nije teško razumijeti, životnu važnost bakra i njegovu regulaciju za normalno i zdravo funkcioniranje organizma, stoga je važno održavanje pravilne ravnoteže u prehrani bakra, zajedno s ostalim mikronutrijentima[26,28].

1. 3. 2. Homeostaza bakra i metabolizam u mozgu

Održavanje transporta i homeostaze bakra unutar stanice zahtjeva različite membranske transportere bakra i podskupine intracelularnih proteina, poznatih kao bakar-šaperoni koji isporučuju bakar do specifičnih intracelularnih odredišta. U skupinu bakar-šaperona ubrajamo: ATOX1, antioksidans-1 (bakar šaperon za ATP-aze, ATP7A i ATP7B), koji prenosi bakar na trans-Golgijevu mrežu, CCS: šaperon za superoksid-dismutazu 1 (SOD1) i COX17: šaperon za citokrom-c-oksidadzu, a u skupinu transmembranskih bakar transportera spadaju CMT1 (copper membrane transporter 1), ATP7A i ATP7B. [35,38,40]. U krvi, 65 do 90% bakra (Cu^{2+}) je vezano na ceruloplazmin, koji je odgovoran za prijenos bakra do tkiva u kojima je potreban. Ostalih 10 do 35% je vezano na albumin, transkuprein i neke komponente niske molekularne težine[28,33,36]. Izmjerene razlike u koncentraciji bakra u krvi, gdje je izmjerena njegova veća koncentracija nego u cerebrospinalnoj tekućini, označavaju krvno-moždanu barijeru kao čimbenika ograničavanja ulaska bakra u mozak[35]. Slika 2. prikazuje metabolizam bakra u mozgu. Unutar barijere koja odvaja krv i cerebrospinalnu tekućinu (CSF), CTR1 (bakar-transporter 1), DMT1 (transporter

divalentnih metala) i ATP7A, prenose bakar iz krvi, odnosno sistemske cirkulacije u cerebrospinalnu tekućinu (CSF), dok ATP7B i CTR1 prenose bakar u suprotnom smjeru[33]. U ekstracelularnoj tekućini, bakar je vezan na specifične nosače bakra ili na enzime. Bakar ulazi u stanice preko transportera bakra, CTR1, koji je lokaliziran na membrani stanice[35]. Jednom kad se nađe unutar stanice, može biti transportiran do mitohondrija za ugradnju u citokrom-c-oksidadzu, a može biti inkorporiran u citoplazmatski Cu/Zn-SOD, tako da se bakar onda u citosolu veže na bakar-šaperone, CCS i ATOX1, koji olakšavaju prijenos bakra do SOD1 i bakar-vezujućih ATP-aza. ATP7A i ATP7B zatim prenose bakar u trans-Golgijevu mrežu za transport van stanice, odnosno u svrhu ugradnje u enzime[35,36]. Ravnoteža bakra u CNS-u je regulirana vrlo jakim kontrolom i kompenzacijskim mehanizmima, koji se aktiviraju i u slučajevima bolesti (kod kojih dolazi do poremećaja u metabolizmu bakra). Metabolizam bakra je reguliran na mnogim razinama specifičnih stanica i molekula, a uključuje kontrolu transkripcije, translacije i posttranslacije[35].



Slika 2. a) Prikaz prolaza bakra u mozak kroz krvno-moždanu barijeru. b) Metabolizam bakra unutar stanica CNS-a. Slika je uređena prema [33] i [35]

1. 4. Cink

Cink je kemijski element sa simbolom Zn i atomskim brojem 30. Prvi je element 12. skupine periodnog sustava elemenata, a atomska masa mu iznosi 65,38[37]. Cink je esencijalan oligoelement, relativno mali ion i nosi dva pozitivna naboja[10,38]. Privlači elektrone kao snažna Lewisova kiselina, a to svojstvo je važno za njegovu katalitičku ulogu. Cink ima relativno fleksibilnu koordinativnu geometriju, te s visokim afinitetom povezuje i izmjenjuje svoje ligande, što olakšava provođenje kemijskih reakcija i bioloških procesa. Sve je to povezano s jednim redoks stanjem, za razliku od željeza i bakra, što eliminira opasnost od nastajanja oksidacijskog stresa, te doprinosi biološkoj važnosti cinka za strukturu i funkciju proteina[10]. Za održavanje potrebne razine cinka u ljudskom tijelu, potreban je dnevni unos od nekoliko miligrama[23].

1. 4. 1. Uloga cinka u organizmu

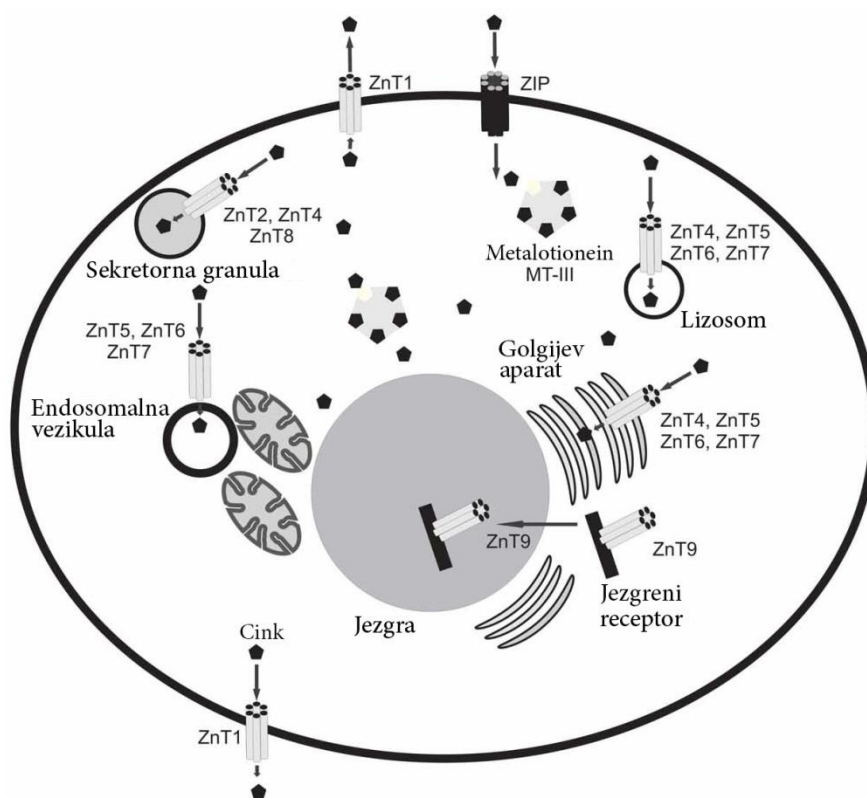
Cink je uključen u brojne procese staničnog metabolizma. Procijenjeno je da oko 10% ljudskih proteina, potencijalno veže cink, a na stotine proteina su uključeni u njegov transport i promet. Cink je potreban za katalitičku aktivnost velikog broja različitih enzima, za fiziologiju osjetila okusa i mirisa, te podržava normalan rast i razvoj organizma tijekom trudnoće, djetinjstva i adolescencije i ima ulogu u zacjeljivanju rana, sintezi proteina i DNA, te djeljenju stanice[28,39]. Vjeruje se da posjeduje antioksidativna svojstva, kroz koja štiti od ubrzanog starenja, te potpomaže procesu zacjeljivanja nakon ozljede[23,28]. Cinkovi ioni imaju učinkovita antimikrobna svojstva, pa čak i u niskim koncentracijama. Ovaj metal ima neprocjenjivu ulogu tijekom bioloških procesa u različitim oblicima (npr. ioni cinka, cink transporteri i cink-albumin kompleks). Cink obavlja svoju biokemijsku funkciju, primarno kao dvovalentni kation, vezan na enzime i druge proteine. Cinkovi atomi imaju specifičnu sposobnost, jer mogu sudjelovati u snažnom, ali lako izmjenjivom vezanju liganada, zajedno s

izrazitom fleksibilnošću u koordinativnoj geometriji, što se pokazalo izuzetno korisnim svojstvom u biološkim sustavima. Oksidacijsko-redukcijski je inertan i ima katalitičke i regulatorne uloge u biologiji stanice. Cink je esencijalan, jer kao ion ima katalitičku, strukturnu i regulatornu ulogu i uključen je u procese homeostaze, procese oksidacijskog stresa, apoptoze i starenja, te fiziologiju imunološkog sustava. Cink štiti biološke strukture i makromolekule od štete uzrokovane slobodnim radikalima kroz nekoliko svojih aktivnosti: pravilnom razinom metalotioneina, kao esencijalna komponenta superoksid-dismutaze (SOD), zaštitno sredstvo za tiole (R-SH), te prevenirajući interakciju željeza u tvorbi slobodnih radikala. Cink-vezujući enzimi imaju nekoliko specifičnih funkcija: katalitičku, ko-katalitičku i strukturnu. Katalitička uloga navodi da je cink izravno uključen u proces enzimske katalize, pa ako dođe do uklanjanja cinka kelatima ili drugim sredstvima, enzim gubi svoja katalitička svojstva. Obično je prisutan jedan katalitički atom cinka po podjedinici enzima. Ko-katalitičku ulogu cink provodi povećanjem ili smanjenjem katalitičke funkcije u kombinaciji s drugim aktivnim mjestima atoma cinka u istom enzimu. Karakteristična forma cinka postoji u cink-vezujućim enzimima, koji sadrže dva ili više atoma metala, te zajedno djeluju kao katalitička jedinica. Ko-katalitička cink-vezujuća mjesta su prisutna u enzimima, koji sadrže dva ili više atoma cinka u bliskoj ili neposrednoj blizini jedan s drugim. Aminokiseline u obliku liganada tvore mostove između cinkovih atoma ili atoma cinka sa drugim metalom. Strukturni atomi cinka su potrebni za strukturnu stabilnost proteina. Cink ima strukturnu ulogu u enzimima, kao što su primjerice: alkohol-dehidrogenaza, aspartat-transkarbamoilaza i protein-kinaza C[39]. Cink određuje aktivnost proteina, tj. receptora i enzima, uključenih u regulaciju sinteze makromolekula, transkripcije gena, te procesa transporta. Također je uključen u očuvanju genomske stabilnosti, kroz uloge u popravku, sintezi i metilaciji DNA. Nadalje, može imati ulogu u unutarstaničnoj signalizaciji, primjerice u živčanom sustavu, gdje djeluje kao neurotransmiter[29]. Homeostaza cinka ima glavnu ulogu u normalnom

funkcioniranju mozga i središnjeg živčanog sustava. S obzirom na veliki broj staničnih procesa, u koje je cink uključen, poremećaji u homeostazi ovog metala mogu imati značajne štetne učinke i posljedice za organizam[28,40].

1. 4. 2. Homeostaza cinka i metabolizam u mozgu

U serumu, cink je primarno vezan na albumin (85 %), α_2 -globuline (16 %) i aminokiseline (1–2 %)[10,39]. Cink je iz krvne sistemske cirkulacije u moždane stanice transportiran preko krvno-moždane barijere. Predloženo je nekoliko mehanizama transporta cinka na staničnu membranu ili unutar stanica. Intracelularni metabolizam cinka u živčanim stanicama prikazuje slika 3. Nekoliko različitih skupina proteina je uključeno u kontrolu i izmjenu staničnog nivoa cinka. U jednu od skupina ubrajamo membranske transportere (ZnT), odgovorne za efluks, tj. izbacivanje cinka iz stanice ili za inluks, odnosno ubacivanje cinka u stanične organele. Druga skupina uključuje članove ZIP obitelji (proteina cink-reguliranih i željezo reguliranih transportera), koji provode transport cinka iz ekstracelularnog prostora ili iz intracelularnih vezikula u citoplazmu. Do sada je identificirano 10 članova ZnT i 14 članova ZIP obitelji proteina. Treću skupinu regulatornih proteina čine metalotioneini (MT), koji predstavljaju skupinu metal-vezujućih proteina, nisko-molekularne težine, te imaju visoki afinitet za cink. Do sada su opisane četiri izoforme metalotioneina: MT-I, MT-II, MT-III i MT-IV. MT-III je specifični član metalotioneina, koji se nalazi u neuronima, a njegova isključiva uloga je privremeno skladištenje staničnog cinka[41]. Homeostaza cinka je kontrolirana kroz koordinirane akcije cinkovih transportera, koji su odgovorni za inluks i efluks cinka, za regulaciju intracelularne i ekstracelularne koncentracije cinka, te za njegovu distribuciju. Transporteri cinka djeluju na stanične događaje na molekularnoj, biokemijskoj i genetskoj razini[28].



Slika 3. Metabolizam cinka unutar neurona. Slika je uređena prema [41]

1. 5. Međudjelovanje željeza s bakrom i cinkom

Željezo je uključeno u seriju međudjelovanja sa raznim esencijalnim i potencijalno toksičnim elementima, te na taj način mijenja njihov metabolizam. Hipoteze o takvim interakcijama željeza su potvrđene eksperimentima na laboratorijskim glodavcima, no s vremenom su brojni autori otkrili i dokazali, da su ti podaci relevantni i značajni i kod ljudi[42]. Preopterećenje željezom u organizmu može imati štetan učinak na metabolizam i regulaciju bakra u organizmu, tako da preopterećenje željeza u prehrani dovodi do deficijencije bakra u organizmu[43,44]. Dokaz da nedostatak bakra ili njegova prisutnost u količini manjoj od fiziološke, u štakora može biti još više smanjena, povećanjem unosa željeza bio je prvi pokazatelj metaboličke interakcije između tih dvaju elemenata. Naknadnim istraživanjima pokazano je da teška deficijencija bakra u dojenčadi predstavlja djelomičan odgovor organizma na terapiju željezom[42]. Pod normalnim, fiziološkim uvjetima, oksidativnom

fosforilacijom u mitohondriju proizvodi se više od 90% ATP u stanici. Mozak treba daleko više energije od drugih organa, što zahtjeva optimalnu proizvodnju ATP u živčanim stanicama[45]. Nedostatak bakra, odnosno njegov manjak u organizmu može biti štetan posebice za neurone. Zbog manjka bakra, dolazi do narušavanja normalnog razvoja mozga, jer se narušavanjem funkcije mitohondrija negativno utječe na metabolizam energije u mozgu[46]. Bakar je kofaktor za aktivnost kompleksa IV ili citokrom-c-oksidge (CCO) u mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona. Nedostatak bakra jako utječe na aktivnost citokroma-c-oksidge[47,48]. Mnoge neurodegenerativne bolesti su blisko povezane s disfunkcijom mitohondrija i poremećajem metabolizma metala u mozgu[46]. Dodatak veće količine željeza u prehrani nepoželjno djeluje i na metabolizam cinka u organizmu[10]. Konzumiranje velike količine željeza putem prehrane reducira, odnosno smanjuje apsorpciju cinka, pa tako i vrijednost koncentracije cinka u krvnoj plazmi, te dolazi do deficijencije cinka u organizmu i posljedično do poremećaja, koji proizlaze iz ovoga stanja[49]. Deficijencija cinka je najznačajnije patološko stanje, koje uključuje poremećaje metabolizma metala u organizmu. Ovaj esencijalni element ima važnu ulogu u obrani stanica od oksidacijskog stresa. Dugoročna deficijencija cinka čini organizam osjetljivijim na oštećenja izazvana oksidacijskim stresom. Nedostatak cinka povećava osmotsku krhkost membrane eritrocita i razinu lipidne peroksidacije u membranama mitohondrija i mikrosoma, dok prisustvo cinka sprječava lipidnu peroksidaciju[39].

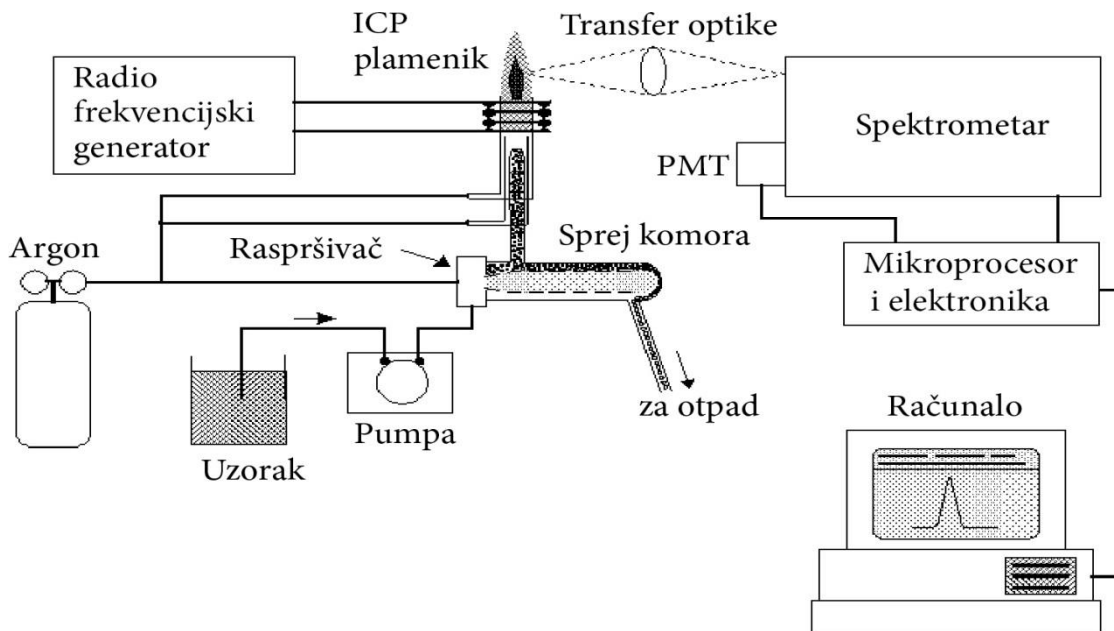
1. 6. Induktivno spregnuta plazma vezana s optičkom spektrofotometrijom (ICP-OES)

Metali su u tijelu vezani na različite vrste makromolekula, u prvom redu na proteine, te ih je u takvoj formi jako teško ili nemoguće identificirati. Stoga je nužno provesti postupak mikrovalne digestije, kojom se postiže otapanje metala i prevođenje u ionsko stanje, kako bi se mogli analizirati ICP-OES metodom[50]. Ova tehnika se obično postiže izlaganjem uzorka

snažnim kiselinama u zatvorenoj posudi i rastućim tlakom i temperaturom putem mikrovalnog zračenja. Ovo povećanje u temperaturi i tlaku uzorka niskog pH medija ubrzava toplinsku razgradnju uzorka i topljivost metala u otopini[51]. Postoje različite metode mikrovalne digestije, no za potrebu pripreme biološkog uzorka najčešće se koristi vlažna mikrovalna digestija u zatvorenom sustavu, koja koristi mikrovalnu energiju, radi zagrijavanja otapala, koji zatim u dodiru s biološkim uzorkom, prevodi ga u otopinu, a priprema uzorka suhim spaljivanjem se provodi na vrlo visokim temperaturama i stoga se jako razlikuje od mokre ili vlažne mikrovalne digestije, koja koristi kemijske reagense, kao što su neoksidirajuće i oksidirajuće kiseline. Odabir odgovarajuće kiseline ovisi o naravi matriksa uzorka. Uzorci sa većim postotkom materijala organskog podrijetla, kao što su biološki materijali, ovim postupkom stvaraju velike količine plinovitih produkata, te su tako potrebne veće temperature da bi došlo do potpunog razaranja, a kod njih dolazi i do povećavanja tlaka unutar kivete, zbog oslobađanja ugljičnog dioksida, stoga je obavezna stroga kontrola tlaka. Reagensi za digestiju kod metode razaranja bioloških uzorka su: koncentrirana dušična kiselina i vodikov peroksid, koji ima ulogu oslobađanja uzorka od dušikovih oksida. Proces se kontrolira cijelo vrijeme tijekom provedbe digestije preko instaliranog programa na kontrolnoj ploči, direktno povezanom sa uređajem. Nakon što su metali prisutni u otopini i slobodni, moguće ih je analizirati ICP-AES, tj. ICP-OES metodom[50].

ICP-OES je optička emisijska spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom, a temelji se na mjerenju inteziteta emitirane svjetlosti, jer pri povratku elektrona iz pobuđenog stanja u osnovno, dolazi do emitiranja elektromagnetskoga zračenja specifične valne duljine[50,52-54]. Svaki element emitira zračenje karakteristične valne duljine. Koncentracija elemenata u uzorku je proporcionalna intezitetu elektromagnetskog zračenja odabrane valne duljine. Kvalitativni sastav, stoga dobivamo određivanjem valnih duljina emitiranog elektromagnetskog zračenja, dok kvantitativni sastav uzorka, mjerenjem njegovog

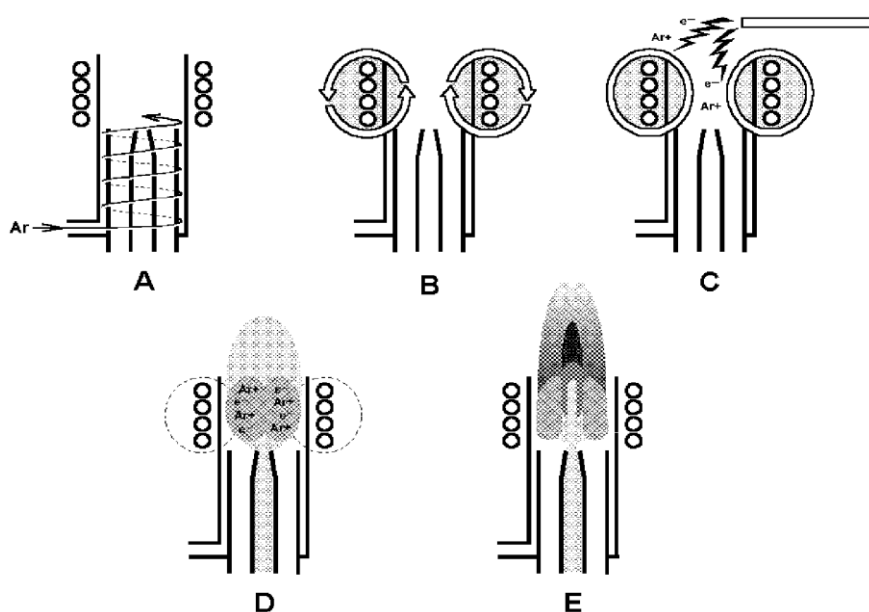
inteziteta[52-54]. U osnovne dijelove svakog ICP-OES instrumenta ubrajamo: sustav za uvođenje uzorka, sustav za sagorijevanje i spektrometar, a prikazani su na slici 4.



Slika 4. Osnovni dijelovi ICP-OES instrumenta. Slika je uređena prema [52]

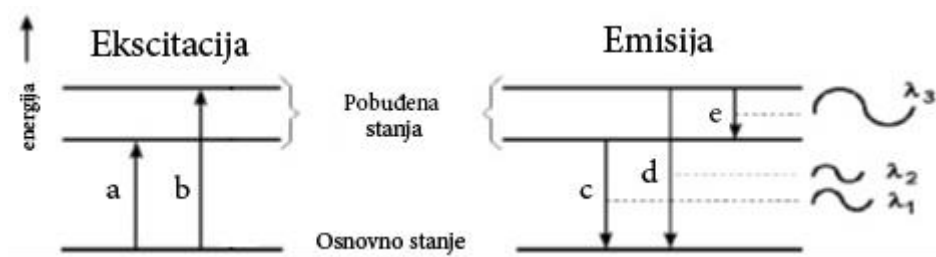
Peristaltičkom pumpom se tekući uzorak potiskuje i prenosi u raspršivač, gdje se otopina prevodi u aerosol (vrlo finu maglu od kapljica uzorka) i koji ubrizgava plinoviti argon u komoru. U posebnoj mlaznoj komori sa sprejem se odstranjuju velike kapi aerosola s uzorkom i argonom, a male (1-5% od ukupne otopine) su nošene strujom plinovitog raspršivača na plamenik (ICP Torch), koji proizvodi plazmu u sustavu za sagorijevanje. Plazma je svaki oblik materije koja sadrži osim neutralnih atoma, radikala i molekula, znatan dio (> 1%) elektrona i pozitivnih iona, ona je električki provodljiv, disociran i visokoioniziran plin. Danas se koristi argon-podržana induktivno spregnuta plazma (ICP), koja može dosegnuti vrlo visoke vrijednosti temperatura između 6 000 K i 10 000 K, a služi kako bi se omogućila jaka atomska emisija što većeg broja kemijskih elemenata. Argonska plazma

sadrži veliku količinu iona argona i elektrona, a opisuje se kao električki provodljiv, visoko ioniziran plin, kemijski inertan, te kao takav ne reagira s analitom iz uzorka[50,52]. Slika 5. prikazuje ICP-plamenik i bakrenu zavojnicu, te slijed paljenja. Bakrena zavojnica, nazvana load coil, okružuje krajnji vrh plamenika i povezana je sa radio frekvencijskim (RF) generatorom. Kada je RF snaga primjenjena na bakrenu zavojnicu, izmjenična struja oscilira. Ova RF oscilacija struje u zavojnicu uzrokuje RF električno i magnetsko polje na vrhu plamenika. Sa plinovitim argonom, koji se kreće kroz plamenik, iskra primjenjena na plin, uzrokuje izbacivanje nekolicine elektrona iz atoma argona. Ovi elektroni su zatim uhvaćeni u magnetsko polje i njime ubrzani. Dodavanje energije elektronima uporabom zavojnice na ovaj način poznat je kao induktivna sprega.



Slika 5. Presjek ICP-plamenika i bakrene zavojnice, koji prikazuje slijed paljenja A - Argon prolazi kroz plamenik. B - RF snaga se primjenjuje na bakrenu zavojnicu. C - Iskra uzrokuje oslobađanje elektrona iz argona. D - Slobodni elektroni su ubrzani RF poljima uzrokujući daljnju ionizaciju i formiranje plazme. E - Raspršivačem nošeni aerosolni uzorak dolazi na plazmu. Slika je uređena prema [52]

Prva funkcija plazme je uklanjanje otapala (desolvatacija), obično ostavljajući uzorak kao mikroskopske čestice. Sljedeći koraci uključuju raspadanje čestica u plin (volatizacija), a zatim prevođenje u atome (atomizacija). Jednom kada je aerosolni uzorak deslovatiziran, u obliku plina i atomiziran, plazma dovodi do ekscitacije, pri čemu elektron iz orbitale tog atoma prelazi iz svog osnovnog stanja u orbitalu dalje od jezgre i višu energijsku razinu. Dijagram energijskih razina i prijelaza prikazuje slika 6. Točni mehanizmi ekscitacije nisu potpuno istraženi, ali vjeruje se da je većina procesa ekscitacije rezultat sudara atoma analita sa energetskim elektronima. Atom je manje stabilan u svojem ekscitiranom ili pobuđenom stanju, pa će se vratiti natrag na manje pobuđeno stanje, emisijom kvanta elektromagnetskoga zračenja, poznatog kao foton. Kao rezultat ovog gubitka energije, elektron se vraća na orbitalu, koja je bliža jezgri. Razlika u energiji između gornje i donje energetske razine u radijacijskom prijelazu određuje valnu duljinu zračenja, koja u njemu sudjeluje.



Slika 6. Dijagram energijskih razina, koji prikazuje energetske prijelaze, gdje a i b predstavljaju ekscitaciju, dok c, d i e emisiju. Horizontalna linija prikazuje energijsku razinu atoma. Vertikalne strelice prikazuju energetske prijelaze. Slika je uređena prema [52]

Odnos između energetske razlike i valne duljine može biti izveden preko Planckove jednadžbe: $E = h\nu$. Zamjenom $\frac{c}{\lambda}$ za ν , dobivamo: $E = \frac{hc}{\lambda}$, iz čega se vidi da je energija obrnuto proporcionalna valnoj duljini, odnosno kako se vrijednost energije povećava,

vrijednost valne duljine se smanjuje i obrnuto. Svaki element ima vlastiti karakterističan komplet energetske razine, pa tako i vlastiti, jedinstven komplet valnih duljina apsorpcije i emisije. Kada se elektroni vraćaju u osnovno stanje, emitiraju specifične valne duljine karakteristične za sastav analiziranog uzorka. Pobuđeni atomi u plazmi emitiraju svjetlost na nekoliko valnih duljina, stoga je emisija iz plazme polikromatska i mora biti rastavljena na pojedinačne valne duljine, tako da se emisija iz svake pobuđene vrste može identificirati i njezin intenzitet može mjeriti bez smetnji sa drugim valnim duljinama. Razdvajanje svjetlosti prema valnim duljinama se općenito vrši ili upotrebom monokromatora, koji propušta svjetlost na jednoj valnoj duljini ili polikromatora, koji propušta svjetlost na nekoliko različitih valnih duljina, odjednom. Prava detekcija svjetlosti, jednom kada je odvojena od drugih valnih duljina se provodi fotosenzitivnim detektorom kao što su foto-multiplikatorna cijev (PMT) ili neke napredne tehnike detekcije, npr. preko charge-injection uređaja (CID) ili sklopa s prijenosom naboja, tj. charge-coupled device (CCD). Kvalitativna informacija uključuje identifikaciju prisutne emisije na valnim duljinama karakterističnim za element od interesa. Kvantitativna informacija se može dobiti preko kalibracijske krivulje, odnosno dijagrama intenziteta emisije u ovisnosti o koncentraciji. Standardne otopine sa poznatim koncentracijama elemenata od interesa se unose u ICP, te im se mjeri intenzitet karakteristične emisije. Ovi intenziteti se mogu zatim prikazati u koncentracijama standarda u obliku kalibracijske krivulje za svaki element. Kada je intenzitet emisije analita izmjeren, uspoređuje se sa kalibracijskom krivuljom tog elementa iz standarda. Računala i softveri korišteni sa ICP-OES instrumentima, matematički predstavljaju ove krivulje kalibracije u svojoj memoriji. Prema tome, nije nužan posao analitičara, da ručno konstruira ove krivulje za određivanje količine elemenata u uzorku[52].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja je analizirati sadržaj metala (cinka i bakra) u živčanom tkivu (mozak) kod preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa.

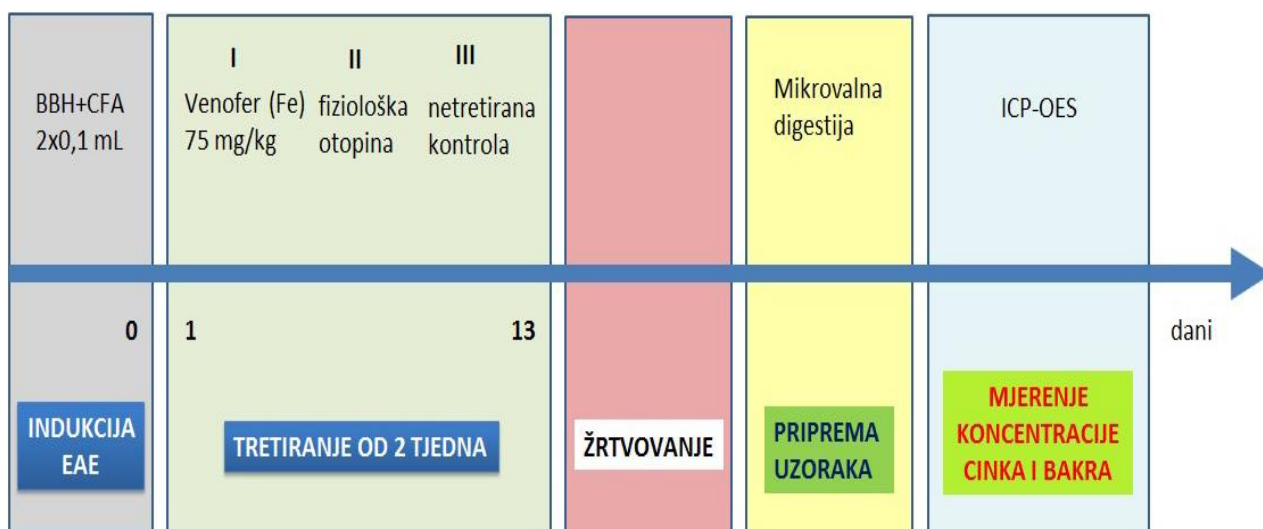
- a) odrediti koncentraciju cinka i bakra u mozgu štakora za dani model
- b) pronaći moguće međudjelovanje cinka i bakra sa sadržajem željeza u organizmu
- c) opisati promjene koncentracije cinka i bakra u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. Plan pokusa

U eksperimentu su korišteni mužjaci Dark Agouti (DA) štakora, koji su stari 7 do 8 tjedana u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE). EAE je induciran davanjem 2 x 0,1 mL emulzije homogenata bijele tvari goveđeg mozga (BBH) i potpunog Freundovog adjuvanta (CFA). Jedna skupina štakora je tretirana preparatom željeza (željezo-saharoza, Venofer®) u dozi od 75 mg / kg u periodu od dva tjedna. Druga skupina je tretirana s fiziološkom otopinom. Prva i druga skupina su tretirane u periodu od 2 tjedna, a treća skupina je skupina netretiranih štakora i predstavlja netretiranu kontrolu. Nakon 13 dana od indukcije EAE, sve skupine štakora su žrtvovane, a pažljivo odstranjeni uzorci mozga su obrađeni i pripremljeni postupkom mikrovalne digestije za mjerenje koncentracije cinka i bakra, ICP-OES metodom. Plan provedenog pokusa prikazuje slika 7.



Slika 7. Shematski prikaz plana eksperimenta

3. 2. Eksperimentalne životinje

Ispitivanja su provedena na štakorima vrste Dark Agouti (DA) muškoga spola, starosti 7 do 8 tjedana. Životinje su smještene pod standardnim uvjetima svjetla, temperature i vlage, te uz neograničen pristup hrani i vodi. Eksperimentalni postupci na životinjama su provedeni u skladu s hrvatskim zakonima i propisima (NN 135/06, NN 37/13, NN 125/13; NN 055/2013) i sa smjernicama direktive vijeća Europske Zajednice (86/609 / EEC). Indukcija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa je provedena davanjem emulzije homogenata bijele tvari goveđeg mozga (BBH) i potpunog Freundovog adjuvanta (CFA) (Sigma, St. Louis, Mo., USA). Svakoj životinji je 2 x 0,1 mL emulzije subkutano injicirano u svaku stražnju šapu. Evaluacija kliničkog stanja je dnevno procijenjivana, koristeći sljedeće kriterije: 0 - nema simptoma; 1 - opuštena paraliza repa; 2 - pareza stražnjih nogu; 3 - paraliza stražnjih nogu s inkontinencijom i 4 - smrt životinje. Muški DA štakori su nasumično podijeljeni u tri skupine: skupina tretirana željezom, kontrolna skupina i skupina netretiranih štakora (n = 5 - 8 životinja po skupini). Skupina tretirana željezom, primila je željezo-vezanu saharozu (Venofer®, Vifor Pharma, Francuska) u dozi od 75 mg/kg tjelesne težine, injektiranu intraperitonealno (i.p.) 6 puta tjedno tijekom dva uzastopna tjedna, kao što je opisano od strane Le et al. (2011). Kontrolna skupina je tretirana na isti način s fiziološkom otopinom kuhinjske soli. Životinje su anestezirane i žrtvovane 13 dana nakon indukcije EAE, a iskrvarile su od intrakardijalnog uboda. Životinje koje su iskorištene za evaluaciju kliničkog tijeka su žrtvovane 30 dana nakon indukcije bolesti.

3. 3. Uzorci tkiva

Nakon povedbe postupka žrtvovanja eksperimentalnih životinja, cijeli mozak štakora se uz uklanjanje okolnog tkiva, precizno i pažljivo odstranjuje, pri čemu je upotrebljen adekvatan plastični pribor i potrebni instrumenti. Mozak je ispiran u puferiranoj fiziološkoj otopini

(PBS), sa svrhom odstranjivanja krvi, te je zatim podvrgnut postupku vaganja i sušenja do daljnje obrade i pripreme za određivanje koncentracije cinka i bakra.

3. 4. Priprava uzoraka i određivanje koncentracije cinka i bakra u tkivu mozga ICP-OES metodom

Uzorci mozga štakora sušeni su u trajanju od 5 sati na 105 °C, a nakon toga su pripremljeni za mikrovalnu digestiju u kivetama, dodatkom 0,5 mL vodikovog peroksida, H_2O_2 i 3,0 mL koncentrirane dušične kiseline, HNO_3 (oboje Merck, Darmstadt, Germany). Mikrovalna digestija moždanog tkiva provedena je na mikrovalnom sustavu MLS 1200 Mega, prilagođenom metodom u trajanju od 5 minuta na 300 W, zatim 30 sekundi na 0 W, te 5 minuta na 600 W i uz 1 minutu ventilacije. Nakon provedbe mikrovalne digestije, uzorci su hlađeni kroz 40 minuta u hladnoj vodi, a zatim prebačeni u odmjerne tikvice od 10 mL, koje su zatim nadopunjene demineraliziranom i redestiliranom vodom za određivanje koncentracija cinka i bakra, ICP-OES metodom. Mikrovalni digestor MLS 1200 Mega prikazuje slika 8.



Slika 8. Mikrovalni digestor MLS 1200 Mega

Na taj način obrađeni i pripremljeni uzorci mozga štakora analizirani su metodom ICP-OES (Induktivno spregnuta plazma povezana s optičkom emisijskom spektrofotometrijom). Nakon provedene kalibracije instrumenta, pripremljeni uzorci su preneseni iz odmernih tkvica od 10 mL u kivete automatskog uzorkovača (autosamplera), te su uneseni u ICP-OES preko pneumatskog raspršivača. Koncentracije cinka i bakra u uzorcima izmjereni su u aparatu pod nazivom ICP-OES Prodigy, Leeman Labs Inc, kojega prikazuje slika 9. Mjerenje je provedeno određenom metodom, koja uključuje sljedeće radne uvjete ICP-OES aparata: aksijalna pozicija plazme, snaga 1,1 kW, 20 L/min hlađenje protokom rashladnog sredstva, nebulizacijski tlak od 40 psi, pumpa s radom od 1,0 mL, te argon kao plin nosilac. Mjerenje je također provedeno i na odgovarajućim valnim duljinam, pa tako su koncentracije cinka određene na valnoj duljini od 213,856 nm, a koncentracije bakra na 324,754 nm.



Slika 9. Prodigy High Dispersion ICP-OES spektrofotometar s pneumatskim raspršivačem, te odgovarajućom programskom podrškom i s autosamplером

3. 5. Statistička obrada podataka

Za obradu rezultata je korišten program na računalu pod nazivom Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija, a kao granica statističke značajnosti uzeto je 5% ($p < 0,05$). Za usporedbu izmjerenih koncentracija u mozgu štakora u modelu EAE prema definiranim i navedenim skupinama, korišten je neparametrijski Mann-Whitney test.

4. REZULTATI

4. REZULTATI

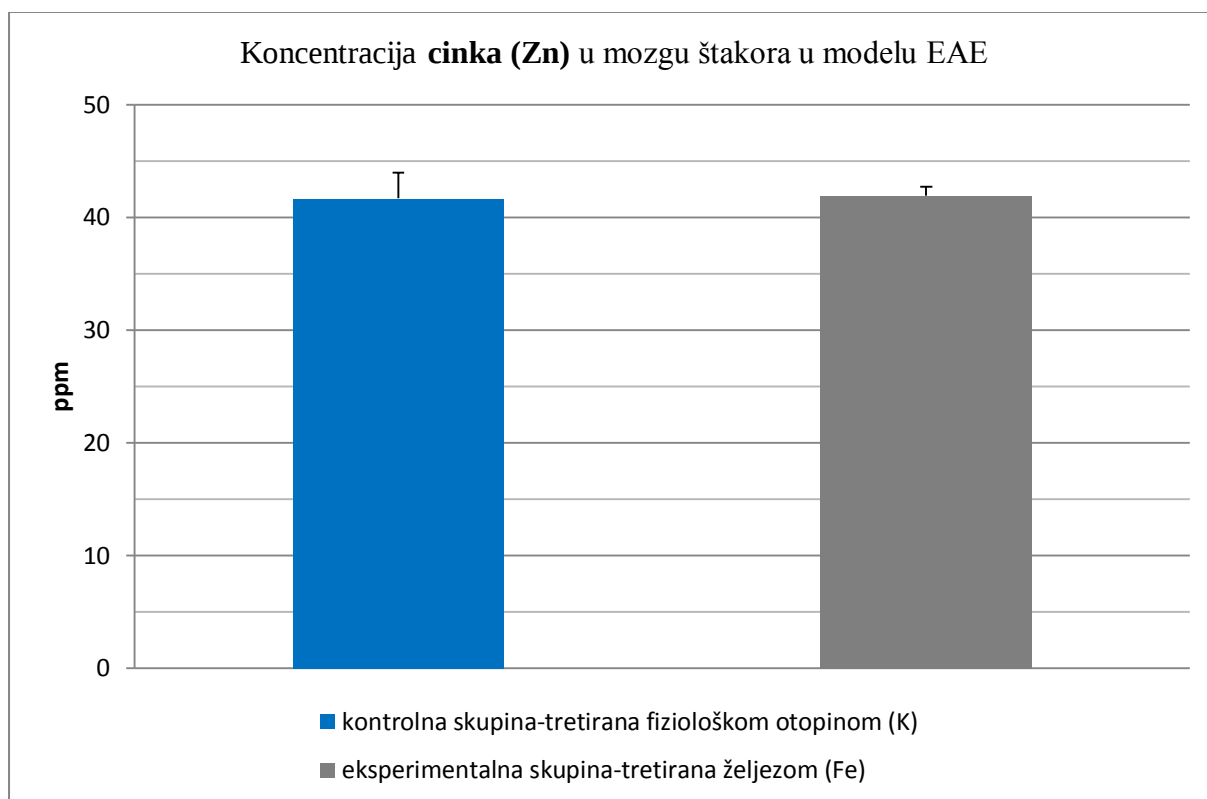
4. 1. Koncentracija cinka (Zn) u mozgu štakora nakon preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)

Tablica 2. Izmjerene vrijednosti koncentracija cinka (Zn) u uzorcima mozga štakora u modelu EAE kod: netretirane skupine (NT), kontrolne skupine (K), tretirane fiziološkom otopinom i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

cink (Zn)					
netretirana skupina (NT)		kontrolna skupina (K)-tretirana fiziološkom otopinom		eksperimentalna skupina (Fe)-tretirana željezom	
uzorak	koncentracija/ppm	uzorak	koncentracija/ppm	uzorak	koncentracija/ppm
132 - 1	37,2445	108 - 1	38,5742	72 - 1	42,9357
135 - 1	45,0957	111 - 1	43,4917	75 - 1	42,7647
138 - 1	39,5693	114 - 1	40,5596	78 - 1	41,2528
141 - 1	42,7516	117 - 1	40,8057	81 - 1	41,2528
		120 - 1	40,5833	84 - 1	41,2528
		123 - 1	45,7373	87 - 1	42,7665
		126 - 1	40,5845	90 - 1	41,3539
		129 - 1	43,3729		
srednja vrijednost	41,1652		41,7136		41,9399
standardna devijacija	3,4585		2,2888		0,8281

Tablica 2. prikazuje izmjerene vrijednosti koncentracije cinka za pojedinačne uzorke triju skupina zajedno sa srednjom vrijednosti, te standardnom devijacijom.

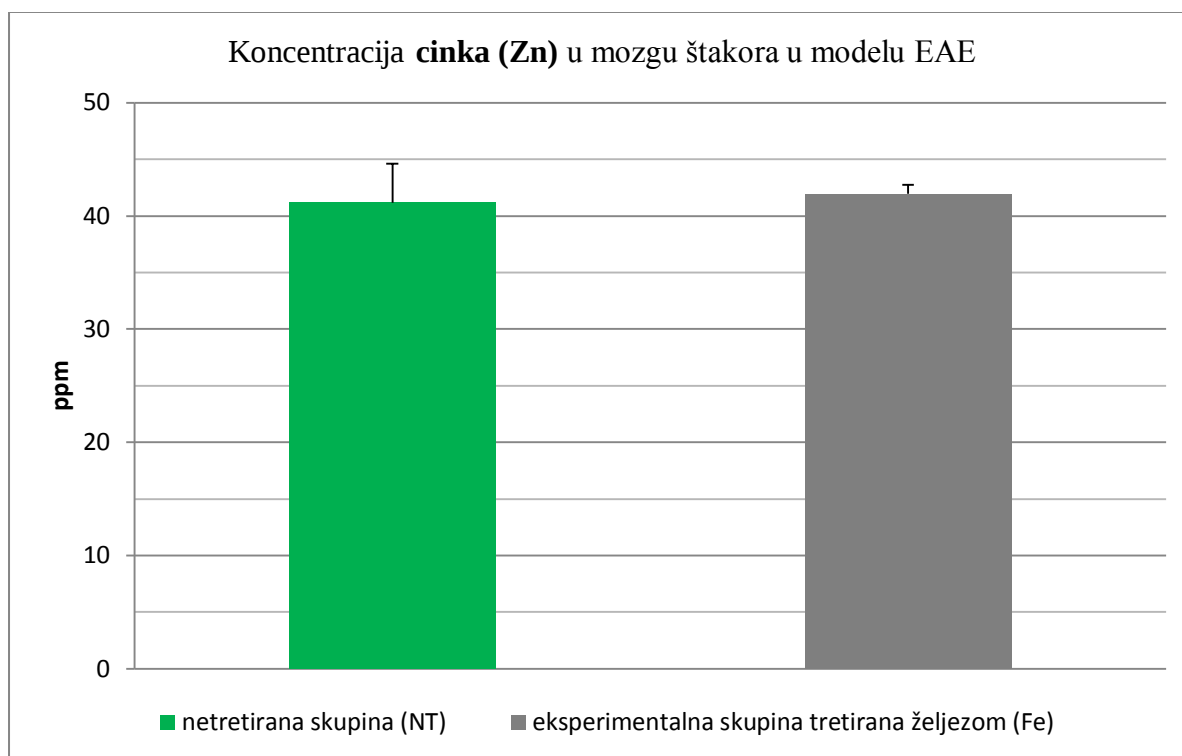
4. 1. 1. Usporedba prema kontrolnoj skupini - cink



Slika 10. Prosječne vrijednosti izmjerenih koncentracija cinka (Zn) u mozgu štakora u modelu EAE kod kontrolne skupine (K), tretirane fiziološkom otopinom i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

Iz slike 10. vidljivo je da se prosječna koncentracija cinka u mozgu štakora u modelu EAE u eksperimentalnoj skupini (Fe), koja je tretirana željezom statistički značajno ne razlikuje u odnosu na prosječnu koncentraciju cinka u kontrolnoj skupini (K), koja je tretirana fiziološkom otopinom.

4. 1. 2. Usporedba prema netretiranoj skupini - cink

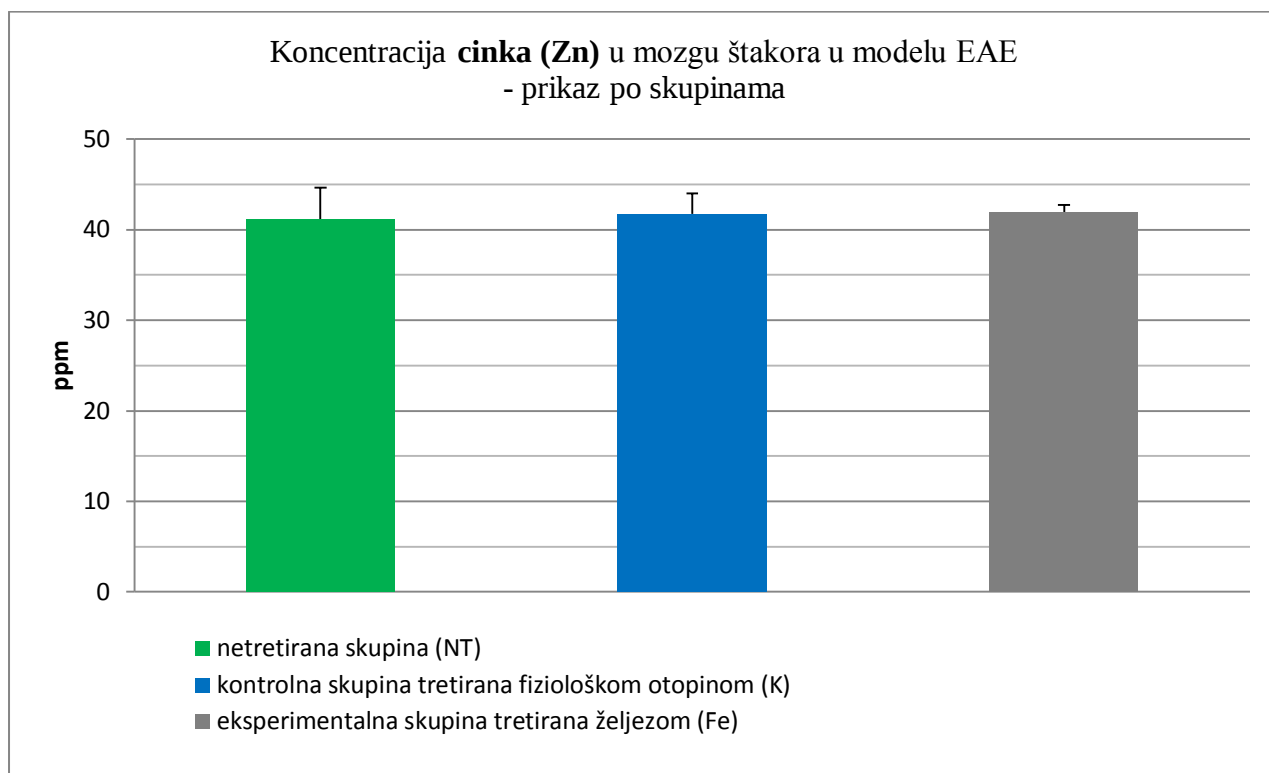


Slika 11. Prosječne vrijednosti izmjerenih koncentracija cinka (Zn) u mozgu štakora u modelu EAE kod netretirane skupine (NT) i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

Na slici 11. možemo vidjeti da razlika prosječnih koncentracija cinka u mozgu štakora u modelu EAE između eksperimentalne skupine (Fe), koja je tretirana željezom i netretirane skupine (NT), nije statistički značajna.

4. 1. 3. Skupni prikaz promjena koncentracije cinka (Zn) u mozgu štakora u modelu

EAE



Slika 12. Prosječne vrijednosti izmjerenih koncentracija cinka (Zn) u mozgu štakora u modelu EAE kod netretirane skupine (NT), kontrolne skupine (K), tretirane fiziološkom otopinom i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

Nakon preopterećenja štakora željezom u modelu EAE iz priložene slike 12. može se vidjeti da je najveća koncentracija cinka u mozgu izmjerena kod eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom, pa slijedi kontrolna skupina (K), tretirana fiziološkom otopinom, a najmanja koncentracija cinka je izmjerena kod netretirane skupine (NT) štakora. Razlike izmjerenih koncentracija cinka u mozgu štakora, kod eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom u odnosu na netretiranu skupinu (NT) i kontrolnu skupinu (K), tretiranu fiziološkom otopinom nisu statistički značajne.

4. 2. Koncentracija bakra (Cu) u mozgu štakora nakon preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)

Tablica 3. Izmjerene vrijednosti koncentracija bakra (Cu) u uzorcima mozga štakora u modelu EAE kod: netretirane skupine (NT), kontrolne skupine (K), tretirane fiziološkom otopinom i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

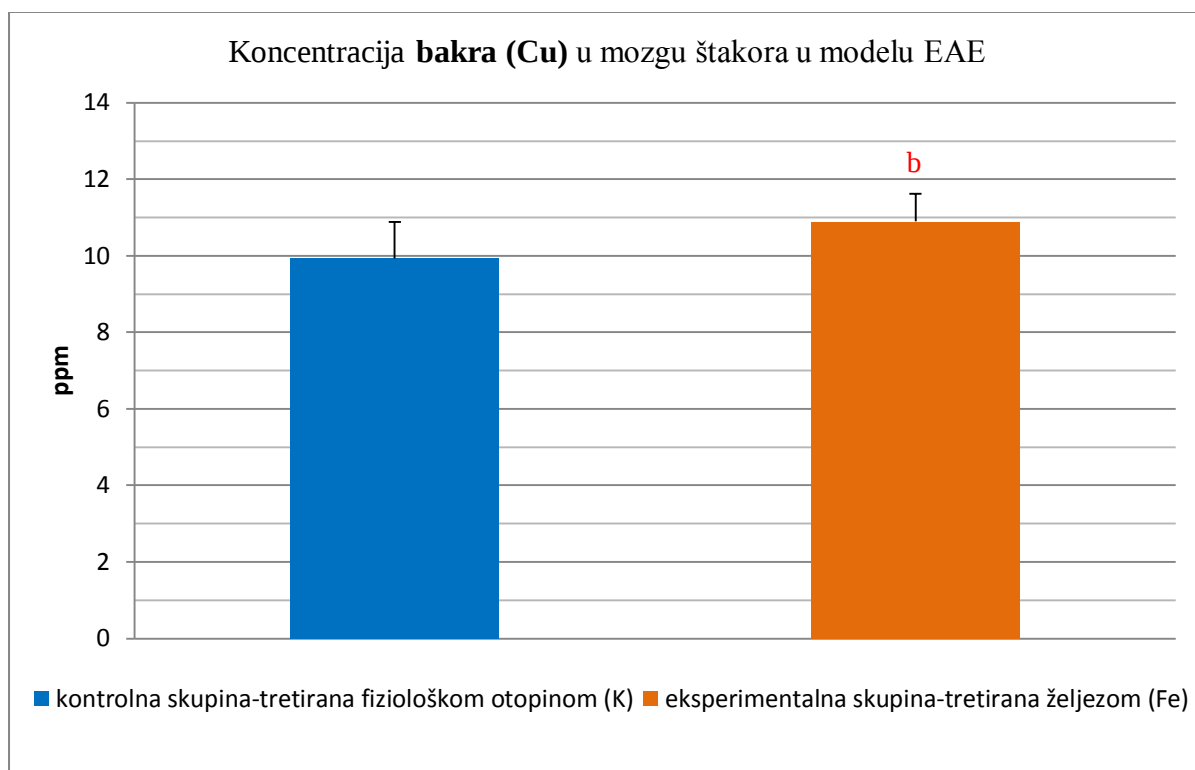
bakar (Cu)					
netretirana skupina (NT)		kontrolna skupina (K)-tretirana fiziološkom otopinom		eksperimentalna skupina (Fe)-tretirana željezom	
uzorak	koncentracija/ppm	uzorak	koncentracija/ppm	uzorak	koncentracija/ppm
132 - 1	8,7140	108 - 1	9,2476	72 - 1	10,9011
135 - 1	10,0060	111 - 1	9,3545	75 - 1	11,4963
138 - 1	9,3100	114 - 1	9,8408	78 - 1	10,9760
141 - 1	9,0798	117 - 1	12,0812	81 - 1	11,3520
		120 - 1	9,2880	84 - 1	11,4718
		123 - 1	10,4019	87 - 1	10,6526
		126 - 1	9,5628	90 - 1	9,4172
		129 - 1	9,7002		
srednja vrijednost	9,2774		9,9346		10,8952^{a, b}
standardna devijacija	0,5442		0,9453		0,7248

a - statistički značajna razlika prema skupini netretiranih štakora (NT), $p < 0,05$

b - statistički značajna razlika prema kontrolnoj skupini štakora (K), tretiranoj fiziološkom otopinom, $p < 0,05$

Tablica 3. prikazuje izmjerene vrijednosti koncentracije bakra za pojedinačne uzorke triju skupina zajedno sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom, te statistički značajnim razlikama u koncentraciji bakra među skupinama.

4. 2. 1. Usporedba prema kontrolnoj skupini - bakar

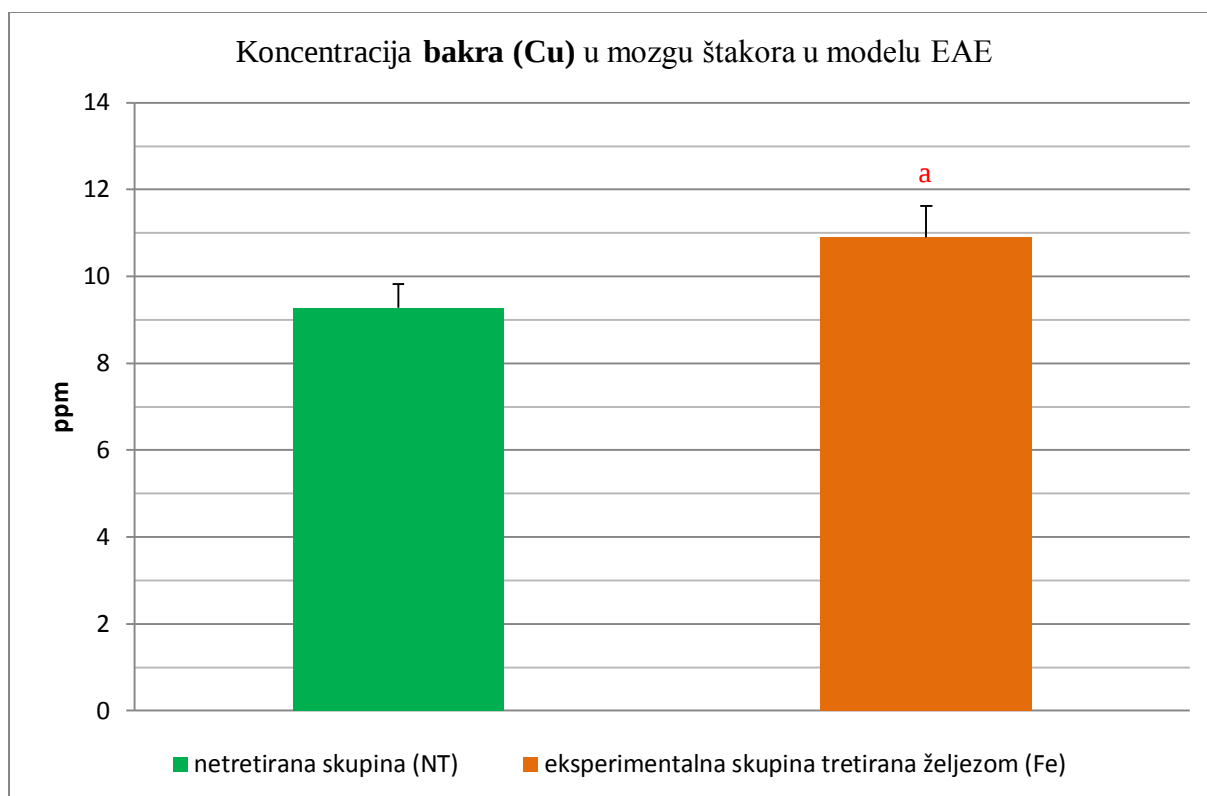


Slika 13. Prosječne vrijednosti izmjerenih koncentracija bakra (Cu) u mozgu štakora u modelu EAE kod kontrolne skupine (K), tretirane fiziološkom otopinom i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

b - statistički značajna razlika prema kontrolnoj skupini štakora (K), tretiranoj fiziološkom otopinom, $p < 0,05$

Iz priložene slike 13. vidljivo je da se prosječna koncentracija bakra u mozgu štakora u modelu EAE kod eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom, statistički značajno razlikuje u odnosu na prosječnu koncentraciju bakra kod kontrolne skupine (K), tretirane fiziološkom otopinom ($p < 0,05$).

4. 2. 2. Usporedba prema netretiranoj skupini - bakar



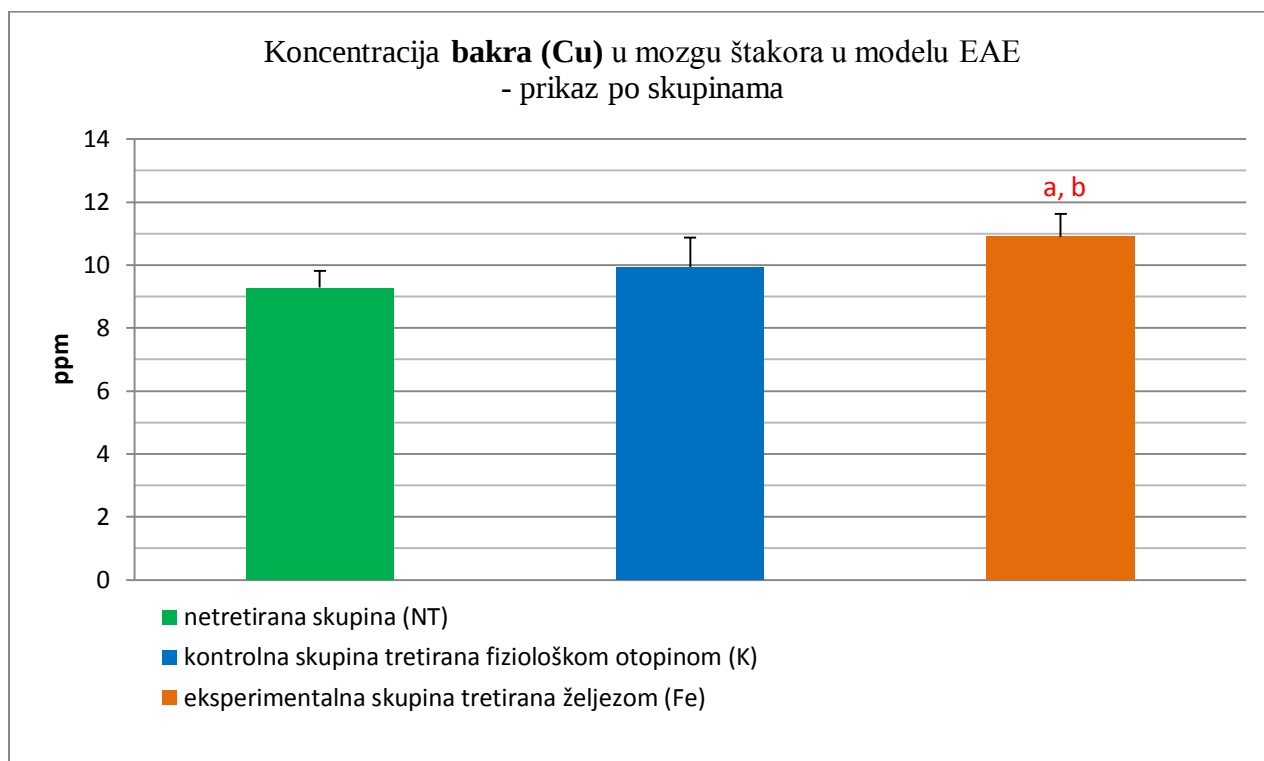
Slika 14. Prosječne vrijednosti izmjerenih koncentracija bakra (Cu) u mozgu štakora u modelu EAE kod netretirane skupine (NT) i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

a - statistički značajna razlika prema skupini netretiranih štakora (NT), $p < 0,05$

Iz slike 14. vidljivo je da se prosječne koncentracije bakra u mozgu štakora u modelu EAE statistički značajno razlikuju između eksperimentalne skupine (Fe), koja je tretirana željezom i netretirane skupine štakora (NT), što je grafički prikazano na slici 11 ($p < 0,05$).

4. 2. 3. Skupni prikaz promjena koncentracije bakra (Cu) u mozgu štakora u modelu

EAE



Slika 15. Prosječne vrijednosti izmjerenih koncentracija bakra (Cu) u mozgu štakora u modelu EAE kod netretirane skupine (NT), kontrolne skupine (K) tretirane fiziološkom otopinom i eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom

a - statistički značajna razlika prema skupini netretiranih štakora (NT), $p < 0,05$

b - statistički značajna razlika prema kontrolnoj skupini štakora (K), tretiranoj fiziološkom otopinom, $p < 0,05$

Nakon preopterećenja štakora željezom u modelu EAE, iz slike 15. vidljivo je da je najveća koncentracija bakra u mozgu štakora izmjerena kod eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom, pa slijedi kontrolna skupina (K), tretirana fiziološkom otopinom, a najmanja koncentracija bakra je izmjerena kod netretirane skupine (NT) štakora. Razlike izmjerenih koncentracija cinka u mozgu štakora, kod eksperimentalne skupine (Fe), tretirane željezom u odnosu na netretiranu skupinu (NT) i kontrolnu skupinu (K), tretiranu fiziološkom otopinom su statistički značajne ($p < 0,05$).

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Patofiziološka stanja tijekom preopterećenja željezom, primjerice promjene serumskih i tkivnih koncentracija elemenata u tragovima, kao što su cink i bakar, predmeti su ograničenoga i maloga broja eksperimentalnih i kliničkih istraživanja, što ujedno predstavlja i jedan od razloga provedbe eksperimenta, ovakve vrste. U provedenom eksperimentu, povodom ovoga završnoga rada pokazalo se da su procesi homeostaze, metabolizam, pa tako i promjene koncentracija željeza i elemenata cinka i bakra, međusobno povezani, što proizlazi iz moguće posljedice njihovih interakcija i djelovanja u različitim uvjetima i modelima bolesti, te mehanizama kompetitivne interakcije željeza sa elementima cinka i bakra između zajedničkih i specifičnih nosača i receptora u stanicama i tkivu organizama. Ovisno o tome koju vrstu eksperimentalnih životinja koristimo u istraživanju i kojega spola, kao i u kojem modelu provodimo istraživanje, te uolikoj količini opterećujemo organizam željezom i u kojem periodu tretiranja, dobiti ćemo različite rezultate[55].

5. 1. Utjecaj preopterećenja željezom na koncentraciju cinka u mozgu štakora u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)

Provedenim eksperimentom utvrđeno je da preopterećenje željezom kod štakora u modelu EAE ne dovodi do značajne promjene koncentracije cinka u mozgu, što možemo vidjeti iz tabličnih i grafičkih rezultata izmjerenih vrijednosti koncentracija cinka u mozgu, prikazanih u tablici 2. i na slikama 10. 11. i 12. Kako se koncentracija cinka u mozgu nakon preopterećenja organizma željezom nije značajno promjenila, možemo pretpostaviti da krvna moždana barijera svojom građom i svojim mehanizmima, učinkovito i čvrsto održava fiziologiju procesa homeostaze i transporta cinka u moždanom tkivu[41]. No tu, također možemo istaknuti činjenicu da željezo i cink u različitim tkivima u organizmu imaju nekolicinu zasebnih i zajedničkih staničnih proteina, transportera, preko kojih se provodi

njihov transport u stanicu i iz nje. Transporter dvovalentnih metala (DMT1) je jedan od zajedničkih transportera cinka i željeza, te su ova dva elementa u kompetitivnoj interakciji za taj transporter. DMT1 je prisutan u različitim stanicama u organizmu, pa tako i u živčanim stanicama, a ima najveći afinitet za transport željeza. No kako je za transport cinka u moždane stanice razvijeno niz drugih proteina transportera u mozgu, specifičnih samo za cink, u slučaju preopterećenosti organizma željezom i zasićenosti DMT1, neće doći do značajnog učinka na procese transporta cinka u mozgu, a ni do njegove značajno promjenjene koncentracije[10,22]. Kao i u ovom eksperimentu gdje nije dokazana statistički značajna razlika u izmjerenoj koncentraciji cinka u mozgu štakora u modelu EAE, između životinja, eksperimentalne skupine, tretirane željezom, kontrolne skupine tretirane fiziološkom otopinom i netretirane skupine, također ni u istraživanju kojega su provodili Vayenas D. V. i suradnici, 1998. godine, objavljenom u *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji cinka u mozgu između životinja, kontrolne skupine i skupine, željezom preopterećenih[55]. Suprotno, Elseweidy M. M. i Abd El-Baky A. E. su u svom radu, objavljenom u *Indian Journal of Experimental Biology*, proveli istraživanje u kojem su pokazali da je tijekom preopterećenja sa željezom usporedbom skupine eksperimentalnih štakora sa kontrolnom skupinom štakora došlo do značajnog povećanja koncentracije cinka u mozgu, željezom tretirane skupine štakora. Takvi rezultati vjerojatno proizlaze u prvom redu zbog različitog odabira modela istraživanja, a zatim i vrste eksperimentalnih životinje, te davane doze željeza za postizanje preopterećenja. Poznata je činjenica da povećana koncentracija željeza u organizmu može inducirati oksidacijski stres, a organizam kao odgovor na to može proizvesti vlastite antioksidativne sustave u borbi protiv nastalog oksidacijskog stresa. Među vlastite antioksidativne sustave ubrajamo između ostaloga i neke komponente koje u svojoj strukturi sadrže cink, kao što su primjerice metalotionenini (MT), superoksid-dismutaza (SOD), koje sprečavaju nepoželjno

djelovanje željeza u tvorbi slobodnih radikala, pa je vjerojatno moguće da se koncentracija cinka u mozgu povećala kao odgovor na povećanje koncentracije željeza, što je slučaj u radu Elseweidy M. M. i Abd El-Baky A. E.[39]. Za razliku od njihovog modela, u ovom radu, provedeno je istraživanje preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE), a kako je dokazano da cink ima centralnu ulogu u fiziologiji imunskog sustava, možemo pretpostaviti da se jedan vjerojatno mali udio cinka u mozgu troši u ovom modelu autoimunosne bolesti, kako bi se u određenoj mjeri održavala normalna funkcija imunskog sustava, što nije slučaj kod istraživanja znanstvenika Elseweidy M. M. i Abd El-Baky A. E., u kojem je uočena značajno povišena koncentracija cinka u mozgu kod preopterećenja željezom[56,57].

5. 2. Utjecaj preopterećenja željezom na koncentraciju bakra u mozgu štakora u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)

Određivanjem koncentracije bakra u mozgu štakora u modelu EAE, u provedenom istraživanju, uočena je statistički značajna razlika, usporedbom izmjerenih koncentracija bakra u mozgu štakora kod eksperimentalne skupine tretirane željezom u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu fiziološkom otopinom i netretiranu skupinu, što je prikazano u tablici 3. i na slikama 13. 14. i 15. Preopterećenje organizma željezom, stoga možemo povezati sa značajnim povećanjem koncentracije bakra u moždanom tkivu. Dokazano je da bakar predstavlja esencijalan kofaktor za aktivnost brojnih enzima, kao što su primjerice: ceruloplazmin, superoksid-dismutaza (SOD) i katalaza. Svi navedeni su endogeni bakar-vezujući, biološki antioksidansi u organizmu, uz bakar-vezujuće metalotionine, tako da će u slučaju povećanja koncentracije željeza u organizmu vjerojatno iz istog razloga kao i kod cinka, doći do povećanja koncentracije bakra, da preko bakar-vezujućih antioksidansa zaustavi štetno djelovanje željezom iduciranih slobodnih radikala[10,29,31]. No, i kao jedan

moćući razlog, možemo istaknuti da je u modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE), narušena krvno moždana barijera, stoga više ne postoji čvrsta regulacija u koncentraciji bakra u moždanom tkivu. U već navedenom istraživanju kojega su objavili D. V. Vayenas i suradnici, 1998. godine u *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, između kontrolne skupine životinja i skupine, željezo preopterećenih, nije pronađena statistički značajna razlika u izmjerenoj koncentraciji bakra u moždanom tkivu, što je u suprotnosti s rezultatima ovoga istraživanja, tijekom kojega je pronađena statistički značajna razlika u izmjerenoj koncentraciji bakra u mozgu kod eksperimentalne skupine tretirane željezom u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu fiziološkom otopinom i netretiranu skupinu. Ovi autori navode kao vjerojatna objašnjenja, da bi se proučavajući različitu regulaciju DMT1 u mozgu mogla objasniti razlika u koncentracijama elemenata u tragovima u mozgu, te navode da s tom svrhom treba provesti dodatna istraživanja[55]. Rezultate istraživanja koji su u potpunoj suprotnosti s ovim eksperimentom prikazani su u radovima Crowe A. i Morgan E. H., koji su 1996. godine u *Journal of Nutrition* pokazali da preopterećenje organizma željezom, statistički značajno smanjuje vrijednost izmjerenih koncentracija bakra u mozgu. Kao moguće objašnjenje njihovih rezultata, možemo istaknuti da je poznata činjenica da bakar i željezo imaju zasebne i neke zajedničke transportere u svim stanicama organizama, preko kojih se odvijaju procesi intracelularnog i ekstracelularnog transporta ovih elemenata. Transporter dvovalentnih metala (DMT1) prenosi željezo u fero obliku (Fe^{2+}), a može prenositi i ostale divalentne ione kao što su: cink, bakar, itd, te kako je poznato za željezo ima najveći afinitet, koji ulazi s divalentnim ionima u kompetitivnu interakciju za ovaj transporter[10,22]. No za razliku od transporta cinka u moždanom tkivu, u slučaju transporta bakra, DMT1 (transporter dvovalentnih metala), predstavlja jedan od glavnih bakar-transportera u živčanim stanicama, tako da ukoliko dođe do zasićenja ovoga transportera sa željezom, usljed preopterećenja organizma željezom, ostali navedeni bakar-

transporteri u moždanom tkivu, vjerojatno ne mogu prebaciti odgovarajuću količinu bakra u moždane stanice zbog zasićenosti DMT1[33]. U istraživanju kojega su proveli Hrvoje Jakovac i suradnici, objavljenom u *Histology and Histopathology*, gdje se ispitivao vremenski tijek ekspresije metalotioneina i tkivnih metala u modelu kronično-relapsirajućeg oblika eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa, pronađena je statistički značajna razlika u koncentraciji bakra u moždanom tkivu, a kao obrazloženje autori navode, kako bakar može direktno katalizirati produkciju hidroksilnih radikala pojačavajući oksidacijsko oštećenje makromolekula, te se može pretpostaviti da tijekom EAE dolazi do vezanja bakra u mozgu, jer u modelu EAE, ovakvoga oblika dolazi do nastajanja oksidacijskog stresa. Dodatnim ispitivanjem metalotioneina uključenih u metabolizam cinka i bakra te općenitog nivoa oksidacijskog statusa, dobila bi se potpunija informacija o promjenama u količini ispitivanih metala[58]. Razumljivo je da različite skupine znanstvenika koji se bave ovom problematikom dobivaju različite rezultate, gotovo sigurno zbog primjenjenih različitih uvjeta provedbe eksperimenta. U tom smislu kod eksperimenata provedenih za istraživanje promjene koncentracije bakra u mozgu, vjerojatno jako veliki utjecaj ima doza kojom se postiže preopterećenje i u kojem periodu se daje, te model bolesti koji se proučava. Širenjem portfelja analiziranih parametara, dobila bi se potpunija informacija o mogućoj dishomeostazi navedenih metala u živčanom tkivu[59].

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i statistički obrađenih rezultata izmjerenih koncentracija cinka i bakra u mozgu štakora u modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE), možemo doći do sljedećih zaključaka:

- ❖ preopterećenje željezom u modelu EAE mijenja sadržaj bakra u mozgu štakora
- ❖ koncentracija bakra je značajno veća u eksperimentalnoj skupini štakora, tretiranih s preparatom željeza u odnosu na kontrolnu, te netretiranu skupinu
- ❖ koncentracija cinka se nije značajno promijenila nakon dodatka preparata željeza u modelu EAE
- ❖ potrebno je dodatno ispitati mehanizam promjene koncentracije bakra u mozgu štakora te promjene ispitivanih metala u serumu i ostalim tkivima

7. LITERATURA

7. LITERATURA

1. Miller SD., Karpus WJ., Davidson TS. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Current Opinion in Immunology.*, 2007. Vol 15. 15.1
2. Constantinescu CS., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology.* 2011. 164(4):1079-106.
3. Experimental autoimmune encephalomyelitis. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Experimental_autoimmune_encephalomyelitis Pristupljeno 19.06.2015.
4. Weissert R. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - Models, Disease Biology and Experimental Therapy. InTech. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/experimental-autoimmune-encephalomyelitis-models-disease-biology-and-experimental-therapy/experimental-autoimmune-encephalomyelitis>
5. Guo L., Li Y., Lin H., Ji X., Li J., Que L., Zhang Y., Rong Y., Wang J. Evaluation of a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis with human MBP as antigen. *Cellular & Molecular Immunology.* 2004. 1(5):387-91.
6. Freund's adjuvant. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Freund's_adjuvant Pristupljeno 21.06.2015.
7. Tota M., Jakovac H., Grebić D., Marinić J., Broznić D., Čanadi-Jurešić G., Milin C., Radošević-Stašić B. Kinetics of tissue iron in experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Biological Trace Element Research.* 2011. 143(1):332-43.
8. Casiday R., Frey R. Iron Use and Storage in the Body: Ferritin and Molecular Representations. Department of Chemistry, Washington University St. Louis, MO 63130. Dostupno na <http://www.chem.iitb.ac.in/~rmv/ch102/hb.pdf>

9. Cherayil BJ. The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunologic research*. 2011. 50 (1):1-9.
10. Caballero B., Allen L., Prentice A. Encyclopedia of Human Nutrition, 2nd Edition. Research Center, Grand Forks, ND, USA. Elsevier Ltd. 2005.
11. Yehuda S., Mostofsky DI. Iron Deficiency and Overload: From Biology to Clinical Medicine. Humana Press. Springer-Verlag New York, LLC. 2009.
12. Guyton AC., Hall, JE. Medicinska fiziologija. 11. izdanje. Medicinska naklada. Zagreb 2006.
13. Karlson P. Biokemija. Školska knjiga. Zagreb 1993.
14. Anderson J., Fitzgerald C. Iron: An Essential Nutrient. Colorado State University. 2010.
15. Mills E., Dong X., Wang F., Xu H. Mechanisms of Brain Iron Transport: Insight into Neurodegeneration and CNS Disorders. *Future Medicinal Chemistry*. 2010. 2(1): 51.
16. Hare D., Ayton S., Bush A., Lei P. A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. Volume 5. 2013. 1-9
17. Wang J., Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal*. 15; 434(3): 365–381.
18. Gamulin S., Marušić M., Kovač Z. Patofiziologija. 7. izdanje. Medicinska naklada. Zagreb. 2011.
19. Sadrzadeh SMH., Saffari Y. Iron and brain disorders. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004. 121:64-70.
20. Tandra L., Salamunic I. Iron metabolism: Current facts and future directions. *Biochemia Medica*. 2012. 22(3):311-28.
21. Zecca L., Youdim MBH., Riederer P., Connor JR., Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004. 5(11):863-73.

-
22. Rouault TA., Cooperman S. Brain Iron Metabolism. *Seminars in Pediatric Neurology*. Elsevier. 2006. 13:142-148.
23. King RB. Encyclopedia of inorganic chemistry, 2nd edition. Wiley. 2005.
24. Štraus B. Medicinska Biokemija. Medicinska naklada. Zagreb. 1992.
25. Copper. Wikipiedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Copper> Pristupljeno 08.06.2015.
26. Krupanidhi S., Sreekumar A., Sanjeevi CB. Copper & biological health. *Indian Journal of Medical Research*. 2008. 128(4):448-61.
27. Stern BR., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw TC., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T. Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2007. 10(3):157-222.
28. Osredkar J., Sustar N. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *Journal of Clinical Toxicology*. 2011. S:3
29. Angelova M., Asenova S., Nedkova V., Koleva-Kolarova R. Copper in the human organism. *Trakia Journal of Sciences*. 2011. Vol. 9, No 1. 88-98.
30. Kuo YM., Zhou B., Cosco D., Gitschier J. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. 5;98(12):6836-41.
31. Soetan KO., Olaiya CO. Oyewole OE. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*. 2010. Vol. 4(5). 200-222.
32. Scheiber IF., Mercer JF., Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology*. 2014. Vol. 116. 33-57.

-
33. Manto M. Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and Roles in Neurodegeneration. *Toxics*. 2014. 2(2), 327-345.
34. Kodama H., Fujisawa C., Bhadhprasit W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Current Drug Metabolism*. 2012. 13(3):237-50.
35. Lutsenko S., Bhattacharjee A., Hubbard AL. Copper handling machinery of the brain. *Metallomics - Royal Society of Chemistry*. 2010. 2(9):596-608.
36. Zheng W., Monnot AD. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012. 133(2):177-88.
37. Zinc. Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Zinc> Pristupljeno 11.06.2015.
38. Milin Č., Domitrović R. Biokemija cinka. *Biochemia Medica*. 2000. Vol. 10. 21-27.
39. Jurowski K., Szewczyk B., Nowak G., Piekoszewski W. Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2014. 19(7):1069-79.
40. Nuttall JR., Oteiza PI. Zinc and the aging brain. *Genes & Nutrition*. 2014. 9(1):379.
41. Szewczyk B. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2013. 19;5:33.
42. Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization. Geneva. 1996. 22-29.
43. Klevay LM. Iron overload can induce mild copper deficiency. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2001. 14(4):237-40.
44. Yu S., Beynen AC. The combined effect of high iron and zinc intake on copper status in rats. *Biological Trace Element Research*. 1994. 42(1):71-9.

-
45. Xu W., Barrientos T., Andrews NC. Iron and copper in mitochondrial diseases. *Cell Metabolism*. 2013. 5;17(3):319-28.
46. Srinivasan S., Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012. 15;53(6):1252-63.
47. Gybina AA., Tkac I., Prohaska JR. Copper deficiency alters the neurochemical profile of developing rat brain. *Nutritional Neuroscience*. 2009. 12(3):114-22.
48. Rossi L., Lombardo MF., Ciriolo MR., Rotilio G. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochemical Research*. 2004. 29(3):493-504.
49. National institutes of health - Iron. <http://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-HealthProfessional/> Pristupljeno: 14.06.2015.
50. Stalović B., Đorđević S. Optical emission spectrometry and inductively coupled plasma (ICP/OES) like analytical technique for determination of heavy metals in biological samples
51. Microwave digestion. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Microwave_digestion Pristupljeno 05.07.2015.
52. Boss CB., Fredeen KJ. Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Second Edition. Perkin-Elmer Corporation. 1997.
53. Hou X., Jones BT. Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry. Encyclopedia of Analytical Chemistry. R.A. Meyers. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000. 9468–9485.
54. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Inductively_coupled_plasma_atomic_emission_spectroscopy Pristupljeno 01.07.2015.

55. Vayenas DV., Repanti M., Vassilopoulos A., Papanastasiou DA. Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*. 1998. 28(3):183-6.
56. Elseweidy MM., Abd El-Baky AE. Effect of dietary iron overload in rat brain: oxidative stress, neurotransmitter level and serum metal ion in relation to neurodegenerative disorders. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008. 46(12):855-8.
57. Shankar AH., Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1998. 68(2):447-463.
58. Jakovac H., Grebić D., Tota M., Barac-Latas V., Mrakovčić-Šutić I., Milin Č., Radošević-Stasić B. Time-course expression of metallothioneins and tissue metals in chronic relapsing form of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Histology and Histopathology*. 2011. 26(2). 233-45.
59. Crowe A., Morgan EH. Iron and copper interact during their uptake and deposition in the brain and other organs of developing rats exposed to dietary excess of the two metals. *Journal of Nutrition*. 1996. 126(1):183-94.

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime: Tedi

Prezime: Fućak

Kvalifikacije: Srednja strukovna kvalifikacija, medicinski tehničar
Redovni student na trećoj godini Preddiplomskog sveučilišnog studija
Sanitarno inženjerstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

Datum rođenja: 15.06.1993.

Mjesto rođenja: Rijeka

Adresa stanovanja: Glavani 46, Kostrena 51221

Broj telefona: 051 289 632

Broj mobitela: 091 9191 171

E-mail adresa: di-te@windowslive.com

OBRAZOVANJE

2012. – Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo na
Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

2008. – 2012. Srednja Medicinska škola u Rijeci, usmjerenje medicinski tehničar-
opći smjer

2000. – 2008. Osnovna škola „Kostrena“

NAGRADE I PRIZNANJA

Nagrada kao najboljem maturantu školske godine 2011./2012.

Priznanje kao najboljem studentu 2. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija Sanitarno inženjerstvo u akademskoj godini 2013./2014.

POSEBNE VJEŠTINE

Strani jezici: Engleski jezik, pasivno služenje u govoru i pismu

Računalo: Aktivno i svakodnevno korištenje interneta, programa Microsoft Office Word, Microsoft Office Excel i Microsoft Office PowerPoint

Vozačka dozvola: B kategorija

OSOBNI INTERESI

Aktivnosti: Pripadnik postrojbe, civilne zaštite Općina Kostrena, opće namjene

 Akcija "EKO Kostrena"

 Prisustvovanje seminarima brzog čitanja u Rijeci

Sportske aktivnosti: Član Karate kluba "9. zmaj" u Rijeci

Hobi: jogging, plivanje, biljar

Natjecanja: šah i biologija