

Promjena koncentracije cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa

Cindrić, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:985083>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Filip Cindrić

PROMJENA KONCENTRACIJE CINKA U JETRI ŠTAKORA
NAKON PREOPTEREĆENJA ŽELJEZOM
U MODELU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNOSNOG ENCEFALOMIJELITISA

Završni rad

Rijeka, 2016.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Filip Cindrić

PROMJENA KONCENTRACIJE CINKA U JETRI ŠTAKORA
NAKON PREOPTEREĆENJA ŽELJEZOM
U MODELU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNOSNOG ENCEFALOMIJELITISA

Završni rad

Rijeka, 2016.

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. Nada Starčević Čizmarević
3. izv.prof.dr.sc. Marin Tota

Rad ima 33 stranice, 9 slika, 1 tablicu i 29 literaturnih navoda.

Ovaj završni rad izrađen je pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marina Tota na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te na Zavodu za fiziologiju i imunologiju. Završni dio rada izrađen je u laboratoriju za kontrolu kvalitete, Rafinerije nafte Rijeka- INA d.d. u Kostreni.

Ovaj rad rezultat je velikog truda mog mentora izv. prof. dr. sc. Marina Tota te mu se ovim putem zahvaljujem na uloženom trudu i vremenu kao i velikoj podršci, strpljenju. Vaši savjeti su mi puno pomogli.

Pokusi provedeni u svrhu ovog rada ne bi bili mogući bez med. lab. ing. Hrvoja Križan i bacc.med.lab.diagn. Roberte Ogrizović, viših tehničara na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci. Puno im hvala na uloženom trudu i vremenu te pružanju mogućnosti prisustvovanja i sudjelovanja u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

Zahvaljujem se i djelatnicima Laboratorija za kontrolu kvalitete, Rafinerije nafte Rijeka-INA.d.d. za pomoć pri analizi metala koja ne bi inače bila moguća.

Posebno se zahvaljujem Biljani Stipetić koja mi je bila podrška za vrijeme studiranja i pisanja ovog rada.

Na kraju hvala mojoj obitelji na iskazanom srpljenju.

SAŽETAK

Multipla skleroza (MS) predstavlja neurodegenerativnu, autoimunu bolest kod koje još nisu u potpunosti istraženi uzroci nastajanja kao niti metode liječenja. U svrhu istraživanja MS često se koristi animalni model eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE). Poznata je uloga željeza koje može izazvati oksidativni stres te cinka koja ima ulogu antioksidansa, a oba metala uključeni su u neurodegenerativne procese. Kako bi razjasnili ulogu cinka i željeza u propagaciji EAE postavili smo model koji uključuje predtretman preparatom željeza (75mg/kg na dan) nakon čega je slijedila imunizacija homogenatom goveđeg mozga (BBH) da bi se izazvao EAE. U eksperimentu su korišteni DA štakori podjeljeni u 5 skupina. Prve dvije skupine su bile predtretirane željezom (eksperimentalna skupina) ili fiziološkom otopinom (kontrolna skupina), a nakon toga je uslijedila indukcija EAE. Kod treće i četvrte skupine nakon predtretmana je odmah uslijedilo žrtvovanje bez indukcije EAE. Peta skupina su netretirane životinje. U svrhu određivanja koncentracije metala u jetri štakora korišteni su postupci mikrovalne digestije, a koncentracije su određene primjenom ICP-OES metode. Rezultati su ukazali da se koncentracija cinka ne razlikuje kod grupa tretiranih fiziološkom otopinom i kod grupa tretiranih željezom. Ipak, primjećena je veća koncentracija cinka kod skupina kod kojih se nakon preopterećenja željezom inducirao EAE u odnosu na skupine bez indukcije EAE.

ključne riječi: željezo, cink, preopterećenje željezom, oksidacijski stres, eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis, multipla skleroza

SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative, autoimmune disease in which causes nor the method of treatment have not yet been fully explored. In order to assess MS, animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is often used. It is known that iron can cause oxidative stress and zinc can act as an antioxidant so that both metals are included in neurodegenerative processes. To clarify the role of zinc and iron in the propagation of EAE we set up a model that includes pretreatment with iron (75 mg/kg per day) followed by immunization with bovine brain homogenate (BBH) to induce EAE. DA rats were divided into 5 groups. Two groups were pretreated with iron (experimental group) or saline (control group), followed by EAE induction. In the third and the fourth group the animals were sacrificed immediately after the pretreatment without the induction of EAE. The fifth group consisted of untreated animals. To determine the concentration of metals in rat liver ICP-OES method was used following the microwave digestion. The results showed no significant differences between the control groups treated with saline and the experimental group treated with iron. However, we observed higher concentration of zinc in the groups pretreated with iron followed by the induction of EAE.

Keywords: iron, zinc, iron overload, oxidative stress, experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis	1
1.2. Oksidacijski stres.....	3
1.2.1. Slobodni radikali	4
1.2.2. Antioksidansi	5
1.3. Metali i njihova važnost u organizmu.....	7
1.3.1. Željezo.....	7
1.3.2. Cink.....	9
1.4. Jetra.....	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Pribor i kemikalije	14
3.2. Eksperimentalne životinje te plan i provedba eksperimenta	14
4. REZULTATI	21
4.1. Koncentracija cinka u jetri štakora nakon prepterećenosti željezom u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)	21
4.2. Usporedba i prikaz koncentracije cinka prema netretiranoj kontrolnoj skupini	22
4.2.1. Koncentracija cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom bez primjene modela eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa (EAE)	22
4.2.2. Koncentracija cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom u modelu EAE	23
4.2.3. Skupni prikaz promjena koncentracije cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom u modelu EAE i bez izazivanja EAE	24
5. RASPRAVA	25
5.1. Promjena koncentracije cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom (bez indukcije eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa)	25
5.2. Promjena koncentracije cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa	27
6. ZAKLJUČCI.....	29
7. LITERATURA	30
ŽIVOTOPIS	34

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis

Jedna od još uvijek nedovoljno iako često istraživanih, bolesti sadašnjice je multipla skleroza (MS). Multipla skleroza je kronična neurodegenerativnu autoimuna upalna bolest središnjeg živčanog sustava, a upale mogu oštetiti veliki i mali mozak, moždano deblo i kraljezničku moždinu[1].

Prvi zapis o MS datira iz 1421. godine gdje su detaljno zabilježeni simptomi i tijekom bolesti tipični za MS kod Sv. Lidvine iz Schiedema. Do ranog 19. stoljeća, MS spada pod neurološke poremećaje to jest paraplegije dok prvu točnu kliničku sliku te patološke promjene vezane uz MS daje Jean Martin Charcot u svom radu objavljenom 1868. godine. U radu daje i dijagnostičke kriterije (Charcotov trijas) ali i naglašava učestalost pojave MS-a i potrebu za pronalaženjem lijeka.

Veliki pomak k tome te razumijevanju patogeneze i etiologije MS-a postigao se je u 20. stoljeću korištenjem animalnog modela MS-a [2]. Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis (EAE) je životinjski model multiple skleroze to jest upale središnjeg živčanog sustava i demijelinizacije koji se koristi u svrhu ispitivanja potencijalnog tretmana MS-a kod ljudi [3]. Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis predstavlja kompleksno stanje opisano interakcijama između različitih mehanizama imunopatofiziologije i neuropatofiziologije.

Modeli EAE su isključivo inducirani modeli ili genetski modificirani modeli za korištenje u laboratoriju u svrhu ocjene imunoloških, neurobioloških i terapijskih studija, a mogu se inducirati u različitim sojevima i kod različitih vrsta životinja. Uglavnom se koriste miševi i štakori zbog dostupnosti uzgojenih sojeva, mogućnosti genetske modifikacije, relativno male veličine i pristupačnosti alata za karakterizaciju glodavaca.

Ipak, treba naglasiti da EAE nije identičan MS-u i nije savršen model, ali ipak daje rezultate jer je najrelevantniji za ljude u proučavanju MS i akutnog diseminiranog encefalomijelitisa (ADEM). Razlika je u tome što životinje treba dodatno imunizirati dok ljudi već posjeduju osjetljivost na autoantigene. Imunizacija na mijelinske antigene postiže se dodatkom bakterijskih komponenti koje aktiviraju urođeni imunološki sustav, a on sadrži receptore za prepoznavanje uzorka. Najčešće korišteni antigeni su homogenat leđne moždine, pročišćeni mijelin, mijelinski protein (mijelin bazični protein, mijelin proteolipid protein i mijelin oligodendrocit glikoprotein) te peptidi tih proteina. Upravo činjenica da su kod EAE antigeni poznati, a kod MS ne čini veliki problem daljnjeg napretka u istraživanju MS-a.

Ovisno o antigenu koji se koristi te genetski modificiranoj životinji može se razviti monofazni, relaps-remitirajući ili kronični oblik EAE. Stoga kod istraživanja treba paziti na odabir vrste EAE i imunizacijskog protokola.

Ono što omogućava da EAE iskoristimo za proučavanje MS-a je da tijekom patoloških procesa i MS i EAE dolazi do narušavanja imunološke ravnoteže *in-vivo* zbog Th-1 posredovnog imunološkog odgovora. Mijelin bazični protein specifične autoimune reaktivne Th-1 stanice prisutne su i u krvi te u organima imunološkog i središnjeg živčanog sustava. Upravo Th-1 stanice proizvode imunološke molekule (kemokine, proupalne citokine, itd.), ali uništavaju krvno-moždanu barijeru i induciraju apoptozu oligodendrocita te uzrokuju gubitak snopova oko živčanog aksona. Povišenje TNF- α i IFN- γ citokina (koje izlučuje Th-1 stanica) karakteristični su i za MS i za EAE [4].

Kao prototip koristi se EAE induciran u Dark Agouti štakora cijelim ekstraktom mijelina s nekompletnim Freundovim adjuvansima ili izvanstaničnom domenom mijelinskim oligodendrocitnim glikoproteinima s kompletnim ili nekompletnim Freundovim adjuvansima.

Kod miševa se najčešće koristi kronični oblik C57BL/6 induciran izvanstaničnom domenom mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina ali i preko kompleksnog Freundovog adjuvanta te pertusis toksina kao adjuvanta [5].

1.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama. Osim toga možemo ga definirati i kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže prooksidativno-antioksidativnog sustava, tj poremećaja ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama na stranu oksidacije [6]. Kod oksidacijskog stresa dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala i nemogućnosti neke stanice da ih razgradi, a uslijed toga dolazi do promjena vezanih uz oštećenje stanice na način da oksidacijski stres može utjecati na strukturu i funkciju biomolekula (kao na primjer polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina). Nastala oštećenja osim što uzrokuju promjene u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici i genetsku terapiju i dovesti do drugih poremećaja.

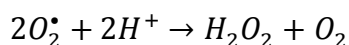
Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, diabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize te procesa starenja [7].

1.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Karakteristika slobodnih radikala je iznimno visoka reaktivnost jer nastoje napuniti valentnu ljusku to jest spariti nespareni elektron [7].

Biokemijski su najznačajniji reaktivni spojevi kisika, dušika i klora. Ovi spojevi stvaraju se u fiziološkim i patološkim stanjima, a djeluju inhibicijski na enzime koji sadrže željezo-sumpor centre i tako oštećuju biomolekule (proteine, lipide i DNA) pa dolazi do oštećenja i smrti stanica [6].

Osim navedenog slobodni radikali izazivaju promjene kemijskih i imunoloških svojstava superoksid-dismutaze (CuZnSOD). SOD su proteini čiji kofaktor sadrži cink, bakar, željezo, nikal ili mangan, a nalaze se u svim stanicama koje metaboliziraju kisik. Kod stanica SOD ima ulogu da štiti stanicu od slobodnih radikala na način da katalizira reakciju dismutacije superoksida:



Na ovaj način umjesto hidroksidnog ($HO^{\bullet}$) nastaje vodikov peroksid i kisik. Više o djelovanju i koristi SOD-a u poglavlju 1.2.2.

Osim što slobodni radikali djeluju kao štetni citotoksični oksidansi na patološkoj razini, djeluju i kao signalne i regularne molekule na fiziološkoj razini. Slobodni radikali svojim citotoksičnim učinkom posreduju u patogenezi kroničnih bolesti, ali i uništavaju patogene aktiviranjem makrofaga u imunološkom sustavu.

Najčešći izvor slobodnih radikala su enzimi i koenzimi s flavinskim strukturama, enzimi koji sadrže Cu i Fe u aktivnom središtu te reakcije prijenosa elektrona u respiratornom lancu u mitohondriju [8].

1.2.2. Antioksidansi

Antioksidansi su skupina molekula koje ako su prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama oksidativnog supstrata zadržavaju to jest onemogućavaju oksidaciju supstrata, ali i kontroliraju odnos između stanja reduciranja ili oksidiranja u biološkom sustavu.

Antioksidansi djeluju na više načina. Jedan od načina je da onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, ali i da uništavaju već stvorene radikale. Također, imaju ulogu popravljanja oštećenja u stanici koja su prouzročili slobodni radikali.

Antioksidanse možemo podijeliti na različite načine, ali možda najvažnija i najjednostavnija podjela je na:

- antioksidacijske enzime i male molekule antioksidansa,
- tzv. „čistače“,

U antioksidacijske enzime ubrajaju se tvari dobro topljive u lipidima i u vodi, a nastaju u stanicama te oni razgrađuju manje aktivne oblike kisikovih radikala u nenabijene neaktivne molekule, ali i u veliku grupu enzima koje obnavljaju slobodnim radikalima oštećene molekule DNA i proteina. Tu spadaju SOD, katalaza i glutation-peroksidaza [7].

Jedan od svakako najvažnijih obrambenih antioksidansa jest enzim SOD. Uloga SOD-a je da katalizira uklanjanje superoksidnog radikala kao što je navedeno u prethodnom poglavlju. SOD dolazi u tri izoforme i upravo zbog njih ima tako veliku učinkovitost. Izoforme se razlikuju po smještaju u stanici i vrsti metalnog iona koji sadrže u svom aktivnom centru. Među njima su:

- Cu/Zn-SOD koji se nalaze u citosolu, a u aktivnom središtu nalaze se ioni Cu ili Zn;
- Mn-SOD koji se nalaze u matriksu mitohondrija, a sadrži Mn;
- ES-SOD štiti izvanstanični prostor, a sadrži ione Cu i Zn [9].

Upravo podjela unutar i izvan stanice omogućava SOD enzimu brzo i djelotvorno uklanjanje slobodnih radikala.

U tzv. „čistače“ spadaju jednostavne i složene molekule koje pretvaraju nezasićene, vrlo aktivne molekule slobodnih radikala u nove, kemijski zasićene, inaktivne oblike koji nisu opasni te stoga i naziv „čistači“. U ovoj skupini su askorbinska kiselina, bilirubin, urati, tokoferol, flavoroidi, likopen glukoza, koenzim Q, albumin i transferin.

Antioksidansi nastaju u stanici ili se u organizam unose hranom putem vitaminskih i sličnih suplemenata.

1.3. Metali i njihova važnost u organizmu

Veliki broj metala uključen je u razne kemijske procese, ali i u biološke aktivnosti. Biološki važne proteinske molekule poput hemoglobina, mioglobina, klorofila i vitamina B, sadrže metale kao sastavne dijelove [10].

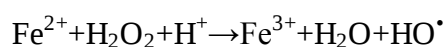
1.3.1. Željezo

Željezo je kemijski element simbola Fe (dolazi od latinske riječi *ferrum*) te mu je atomski broj 26, a atomska masa iznosi 55,84 [11].

Kao biogeni element svrstavano je u grupu esencijalnih elemenata jer sudjeluje u staničnim procesima disanja (prijenosu kisika), redoks procesima, energetskeg metabolizma i regulaciji gena. Željezo ima izuzetnu važnost za život biljaka i životinja jer se nalazi u sustavu hemoglobina u krvi i kloroplasta. Kod čovjeka se nalazi u organizmu (oko 4-5 g kod odraslog čovjeka) i to je 60-70% ukupne količine vezano za hemoglobin, 10% u mioglobinu, 20-30% ga se nalazi u sluznici dvanaesnika, jetri, slezeni i koštanoj srži u obliku feritina i hemosiderina gdje je u funkciji rezerve.

U ljudskom organizmu je važna ravnoteža željeza te je ona regulirana kompleksnim mehanizmom u svrhu održavanja homeostaze. Ljudski organizam ima slabu sposobnost ekstrakcije željeznih iona te se ona postiže regulacijom resorpcije željeza u tankom crijevu. U resorpciji važan je vitamin C jer ju pospješuje te utječe na proizvodnju hemoglobina. U ljudskom organizmu ne postoji adekvatan način izlučivanja viška željeza standardnim fiziološkim putevima to jest bubrezima, plućima ili kožom pa je apsorpcija željeza iz duodenuma primarni regulator količine željeza. Višak željeza u organizmu se izlučuje ali ipak dio ostaje u crijevima, žuči, urinu, znoju, noktima i kosi.

Željezo se pojavljuje u dva oksidacijska stanja fero (Fe^{2+}) i feri (Fe^{3+}). Upravo to svojstvo omogućava da sudjeluje u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama to jest da slobodno željezo katalizira reakcije oksidacije, pa nastaju reaktivni i štetni slobodni radikali, odnosno visoke koncentracije željeza u takvim slučajevima djeluju toksično. Upravo fiziološka važnost željeza dolazi iz njegove sposobnosti primanja i davanja elektrona te ga čini važnim dijelom citokroma i molekula koje vežu kisik, ali iz tog razloga dolazi i opasnost jer kao katalizator sudjeluje u reakciji konverzije vodikovog peroksida do slobodnih radikala prema reakciji:



Iz navedenog slijedi da je željezo u organizmu uvijek kemijski vezano. Fiziološki se uvijek veže za specifične proteine stvarajući proteinske komplekse (reverzibilne spojeve željeza i proteina). U spoju s nekim specifičnim proteinima nastaju upravo hemoglobin, mioglobin, feritin te razni enzimi. Dio željeza koji se nalazi u cirkulaciji plazme vezan je za protein transferin.

Ukoliko organizam preopteretimo željezom dolazi do pojačane sinteze feritina u parenhimalnim stanicama jetre [12].

Nakupljanje željeza u CNS-u može promovirati patogenezu MS stvaranjem veće količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i medijatora upale, a može dovesti i do poremećene funkcije mitohondrija. S druge strane, nedostatak željeza može pružiti zaštitu od razvoja EAE reguliranjem funkcije autoagresivnih CD4^+ T-stanica jer one traže normalan status željeza za svoju optimalnu ulogu [13,14].

1.3.2. Cink

Cink je kemijski element čiji je atomski broj u periodnom sustavu elemenata 30. Simbol cinka je Zn (latinski od *Zincum*), a atomska masa mu iznosi 65,409.

Cink i njegovi spojevi su otrovni, ali i neophodni za život jer se nalaze u enzimima. U odraslom čovjeku nalazi se od 1,5 do 2,5 g cinka, a prisutan je u svim organima, tkivima, tekućinama i izlučevinama. Najvažnija uloga mu je korištenje za rast i obnovu stanica, integracija stanične membrane, uravnoteženje djelovanja inzulina i koncentracije glukoze u krvi. Također je potreban za mineralizaciju kosti te zacjeljivanje rana. Osim toga modulira proces prijenosa staničnog signala, sudjeluje u ekspresiji gena te je važan za polinukleotidnu transkripciju i translaciju [15]. Cink privlači elektrone te je to važno za njegovu katalitičku ulogu, ali je i oksidacijsko-redukcijski inertan. Katalitička uloga potječe od uključenosti cinka u proces enzimske katalize. Uglavnom je prisutan jedan katalitički atom cinka po enzimu. Tada cink ima strukturnu ulogu kod enzima alkohol-dehidrogenaza, aspartat-transkarbomilaza i protein-kinaza [16].

Važnost cinka kao esencijalnog metala dolazi upravo iz činjenice da ima katalitičku, ali i strukturnu i regulatornu ulogu. Cink je tako uključen u procese homeostaze, procese oksidativnog stresa, apoptoze i starenja, ali i fiziologiju imunološkog sustava, sintezu proteina, DNA i dijeljenje stanice.

Svoju ulogu obavlja kao ion cinka, cink transporter i cink-albumin kompleks i sve to kao divalentni kation. Istraživanja su pokazala da 10% ljudskih proteina veže cink, a puno veći broj sudjeluje u transportu cinka kroz organizam, dok su sadašnja istraživanja usmjerena na to da se dokaže da cink ima antioksidativna svojstva. Antioksidativno svojstvo bi značilo da cink štiti od ubrzanog starenja te pomaže u procesu zacjeljivanja [15]. Cink štiti biološke

strukture i makromolekule od štete uzrokovane upravo oksidativnim stresom to jest slobodnim radikalima i to na više načina:

- kao esencijalna komponenta superoksid-dismutaze (SOD),
- osigurava pravilnu razinu metalotioneina,
- djeluje kao zaštitno sredstvo za tione,
- prevenira interakciju željeza u stvaranju slobodnih radikala.

Slijedi zaključak da cink vrlo povoljno djeluje protiv oksidativnog stresa. On, ukratko, djeluje kao antioksidans, zaštićuje enzime i proteine od napada slobodnih radikala, ali i sprječava nastanak slobodnih radikala. Možemo reći da su koncentracija cinka i oksidacijski stres u obrnuto proporcionalnom odnosu. Ukoliko dođe do smanjenja koncentracije cinka u organizmu, dolazi odmah i do povećanja osjetljivosti na oksidacijski stres [17].

Kod preopterećenja željezom važno je njegovo djelovanje kao antagonista redoks aktivnih metala kao što je željezo, pa na taj način sprječava stvaranje slobodnih radikala te time i oksidacijski stres. Nedostatak cinka u organizmu može dvesti do poremećaja u rastu, imunodeficijencije te neuronskih i osjetljivih poremećaja [18].

Osim veze između cinka i oksidacijskog stresa istražena je i veza između cinka i EAE. Cink je tako povezan s T_H1 i T_H17 stanicama. Tako cink značajno smanjuje razvoj EAE jer potiskuje razvoj T_H stanica te izaziva stvaranje reaktivnih vrsta kisika. Osim toga aktivira postsinaptičke stanice to jest djeluje kao regulator sinaptičke transmisije i plastičnosti [19].

U organizmu cink se uglavnom veže za aminokiseline, α_2 -globulin te albumin. Prolazak stanicama omogućuje više različitih skupina proteina kao membranski transporteri (ZnT) koji mu omogućuju ulazak iz stanične organele. Zatim proteini cink regulirani i željezo regulirani transporteri koji cink transportiraju u citoplazmu. Tu spadaju i metalotioneini to jest metal vezujući proteini koji imaju visok afinitet za cink, a nalaze se u neuronima te imaju

ulogu skladištenja cinka. Upravo su transporter i zaduženi i za regulaciju cinka u organizmu to jest homeostazu cinka [20].

Metalotioneini (MT) su skupina niskomolekulskih proteina koji se nalaze u citosolu, a bogati su cisteinom. Oni imaju sposobnost fiziološkog vezanja teških metala kao što su cink, bakar, selen, kadmij i drugi. Trenutno su identificirane četiri izoforme kod sisavaca (MT I-IV) te 13 MT-sličnih proteina. MT I i MT II nalazimo u svim mekim tkivima dok npr. MT III nalazimo pretežito u mozgu. Najveća koncentracija MT u tijelu se nalazi u jetri, bubrezima, crijevima i gušterači. Postoji znatna varijacija razine MT u jetri različitih vrsta sisavaca. Kod ljudi, pasa, mačaka, svinja i koze u raspon je od 400 do 700 mg/g. jetre dok je kod zečeva i glodavaca raspon od 2-10 mg/g jetre.

Metalotionein igra veliku ulogu u metaboličkoj regulaciji cinka, koji može biti strukturni i/ili katalitički element u više od 300 enzima iz svih šest skupina. Osim strukturne uloge, cink ima veliku ulogu i u staničnoj signalizaciji kada se sa MT otpušta prilikom povećanja sadržaja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Direktno, cink-MT možemo zapravo sagledati kao proteine koji reguliraju metaloproteinaze te transkripcijske čimbenike ovisne o metalima. Također, MT imaju veliku ulogu u procesu apoptoze redistribucijom intracelularnog sadržaja cinka jer se stanični cink smatra inhibitorom apoptoze.

1.4. Jetra

Jetra (dolazi od grčke riječi *hepar*) spada u organe po život važne za ljude i životinje, a kod ljudi je i najveća žlijezda u tijelu. Kod odraslog čovjeka jetra je crvenosmeđi mekan organ klinastog oblika. Jetra se nalazi neposredno ispod ošita u abdominalnoj šupljini te teži od 1200-1600 g. Sastoji se od dva nejednaka režnja. Važnost jetre proizlazi iz broja njenih

funkcija. Jetra obavlja sintezu proteina, detoksifikaciju kemijskih spojeva, odlaže glikogen i proizvodi krvne bjelancevine te žuč (egzogeni sekret jetre). Ukratko rečeno, jetra služi za skladištenje hranjivih tvari i neutraliziranje štetnih tvari.

U jetri se odvijaju važni metabolički procesi vezani za ugljikohidrate, lipide, proteine i druge dušikove spojeve. Osim što se u jetri detoksificiraju tvari, u njoj se pohranjuje željezo te različiti vitamini (vitamin A, D, E, K i B₁₂). U jetri se stvara i većina lipoproteina, a ugljikohidrati i proteini se pretvaraju u masti. Sintetizira se i veća količina kolesterola. Osim kolesterola, jetra vrši i sintezu masnih kiselina, fosfolipida i lipoproteina [21].

Jetra među ostalim koristi i aminokiseline za sintezu vlastitih proteina i proteina plazme. Neki od proteina koji tako nastaju su imunoglobini, ali i transportni proteini (transferin, haptoglobin, ceruloplazmin). Uloga transportnih proteina koji nastanu u jetri je prijenos željeza, bakra te drugih tvari iz jetre unutar organizma [22]. Kao što smo spomenuli u poglavlju 1.3. jetra ima značajnu ulogu kod preopterećenja željezom. U jetri dolazi do pojačane sinteze feritina koja premašuje sposobnost lizosoma da izluče željezo. Tada lizosomi pretvaraju feritin u hemosiderin za koji se smatra da uključuje denaturaciju molekule apoferitina. Stoga i feritin i hemosiderin imaju zaštitnu ulogu kod preopterećenja željezom jer održavaju intracelularno željezo u vezanom obliku [12].

Jetra je organ koji ima veliku moć obnavljanja. Ipak, moguća su i oštećenja. Biotransformacija alkohola, lijekova kao i nakupljanje minerala dovode do stvaranja slobodnih radikala. Slobodni radikali oštećuju jetrene stanice te dolazi do poremećaja funkcije jetre [22].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je analizirati sadržaj cinka u jetri štakora kod preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa.

Koraci obrade cilja su sljedeći:

- a) Odrediti koncentraciju cinka u jetri štakora sa ili bez izazivanja EAE nakon preopterećenja željezom;
- b) Pronaći moguće međudjelovanje željeza sa sadržajem cinka u jetri štakora kod eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa.

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pribor i kemikalije

Prilikom izrade ovog završnog rada korišteni su sljedeći uređaji i kemikalije:

- uređaj za mikrovalnu digestiju (MLS 1200 Mega, Milestone, Italija);
- uređaj za ICP-OES (Prodigy High Dispersion ICP Spectrometer, Leeman Labs Inc., SAD);
- plazma (Pure standart solution, Leeman Labs Inc., SAD);
- dušična kiselina HNO_3 , konc. (Merck, Njemačka);
- vodikov-peroksid H_2O_2 , otopina min. 30% (Kemika, Hrvatska).

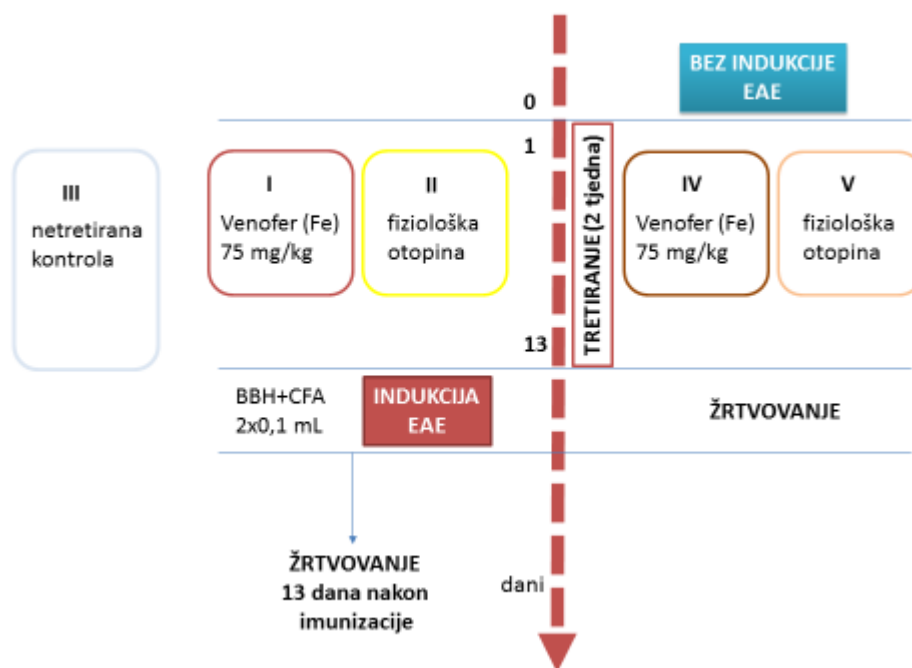
3.2. Eksperimentalne životinje te plan i provedba eksperimenta

Istraživanja eksperimentalnog autoimunosnog encefalomijelitisa provode se na štakorima. Eksperimentalni postupci koji uključuju životinje u skladu su s hrvatskim zakonima i propisima (NN 135/06, NN 37/13, NN 125/13, NN 055/2013) te sa smjernicama Direktive Vijeća Europske Zajednice (86/609/EEC).

Ispitivanja u svrhu pisanja ovog rada provedena su na mužjacima štakora Dark Agouti, starosti od 7 do 8 tjedana. Eksperimentalne životinje su iz vlastitog uzgoja (Zavod za fiziologiju i imunologiju, MEDRI). Držane su u standardnim uvjetima uz pristup hrani i vodi *ad libitum*. Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis je induciran pomoću homogenatne emulzije bijele tvari goveđeg mozga (BBH) u potpunom Freundovom adjuvansu. Štakori su nasumično podjeljeni u pet skupina (Slika 1.). U dvije skupine induciran je EAE, dok se kod preostale dvije skupine indukcija nije provela. Dvije od skupina (jedna s induciranim EAE i jedna bez indukcije EAE) tretirane su preparatom željeza (željezo-

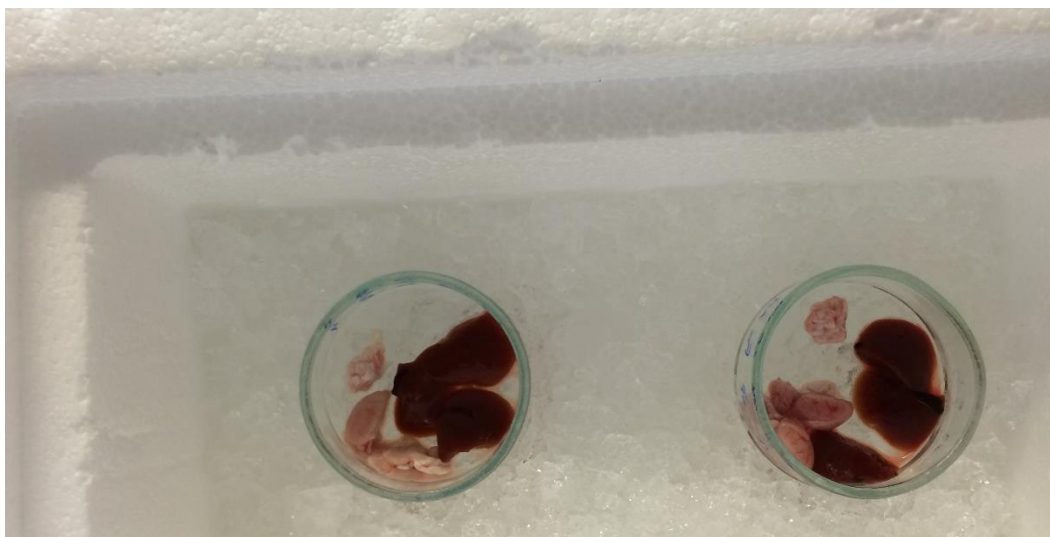
saharozom) u dozi od 75 mg/kg u periodu od dva tjedna (6 puta tjedno). Druge dvije skupine (jedna s induciranim EAE i jedna bez indukcije EAE) su tretirane s fiziološkom otopinom natrijevog klorida na analogan način kao i skupine tretirane željezom. Zadnja, peta skupina, je netretirana skupina te ona predstavlja neutralnu kontrolu. Tokom dva tjedna svakodnevno se vršila procjena kliničke slike koristeći kriterije:

- 0 – nema simptoma;
- 1 – opuštena paraliza repa;
- 2 – pareza stražnje noge;
- 3 – paraliza stražnjih nogu s inkontinencijom;
- 4 – smrt životinje.



Slika 1. Plan pokusa

Nakon 13 dana tretiranja (kod skupina bez indukcije EAE i kod netretiranih životinja) te 13 dana nakon indukcije EAE (kod skupina s indukcijom EAE) izvršeno je žrtvovanje eksperimentalnih životinja. Eksperimentalne životinje su anestetizirane te su iskrvarile od intrakardijalnog uboda. Žrtvovanje i vaganje su izvršile djelatnice Božena Ćurko-Cofek i Tanja Grubić Kezele (djelatnice Zavoda za fiziologiju i imunologiju, MEDRI). Na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci je obavljeno tretiranje i žrtvovanje životinja dok je na Zavodu za kemiju i biokemiju istog fakulteta napravljena priprema uzoraka za analizu sadržaja metala. Analiza sadržaja metala napravljena je u laboratoriju INA-Rijeka na Urinju pod vodstvom ing. Zlatko Ciganj. Za uzimanje organa (mozak, ledna moždina i jetra) štakora korišten je adekvatan plastičan pribor. Organi su isprani u puferiranoj fiziološkoj otopini da bi se otklonila krv (kao što je prikazano na Slici 2.).



Slika 2. Organi DA štakora nakon uklanjanja i čišćenja (mozak, jetra i ledna moždina)

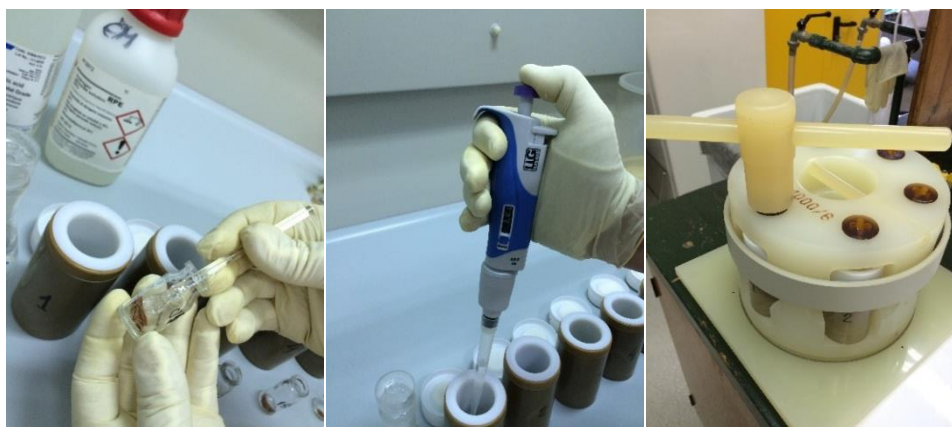
Uzorci jetre su izvagani te je uslijedilo sušenje u sušioniku na 105°C do konstantne mase (Slika 3. lijevo) u trajanju od 5 sati. Između sušenja i daljnjih postupaka uzorci su čuvani u eksikatoru (Slika 3. desno), a prije same analize raščinjani su mikrovalnom digestijom.



Slika 3. Lijevo je prikazan sušionik, a desno su prikazani uzorci pohranjeni u eksikatoru

Metodom digestije uzorak se prevodi iz čvrste faze u otopinu. Uporabom visoke temperature i oksidirajućih reagenasa komponente iz matrice prevode se u jednostavnije oblike, a često se uklanja i sama matrica. Sredstva za digestiju mogu biti bazna ili kiselinska. Mikrovalna digestija spada u kisele digestije to jest koristi se kiselina [23].

Osušeni uzorci se stružu pomoću staklenog štapića (Slika 4. lijevo) te su u kivetama razgrađeni dodavanjem 3,0 mL koncentrirane HNO_3 i 0,5 mL H_2O_2 (postupak prikazan na slici 4. sredina).



Slika 4. Obrada uzorka prije mikrovalne digestije

Tako pripremljene kivete stavljene su u bubanj (Slika 5. desno) koji se umeće u uređaj za mikrovalnu digestiju (model uređaja naveden u poglavlju 3.1. i prikazan na slici 4 lijevo).

Mikrovalna digestija provedena je prilagođenom metodom i to na način: 5 minuta na 300 W, 30 sekunda na 0 W te 5 minuta na 600 W i zatim 1 minuta ventilacije. Nakon što je postupak mikrovalne digestije završio uzorci su ohlađeni 40 minuta pomoću strujanja hladne vode (Slika 5. sredina). Uzorci su zatim prebačeni u odmjerne tikvice od 10 mL te dopunjeni redestiliranom i demineraliziranom vodom (Slika 5. desno).



Slika 5. lijevo – uređaj za mikrovalnu digestiju; sredina – postupak hlađenja nakon mikrovalne digestije; desno – razrijeđeni uzorci



Slika 6. Postupak prenošenja uzorka iz odmernih tikvica u kivete autosamplera ICP-OES

Iz odmernih tikvica uzorci su prebačeni u kivete automatskog uzorkovača (autosamplera) u svrhu provođenja analize pomoću induktivno spregnute plazmom povezane

s optičkom emisijskom spektrofotometrijom (ICP-OES) to jest određivanja koncentracije metala u uzorku (Slika 6.).

Induktivno spregnuta plazma povezana s optičkom emisijskom spektrofotometrijom (ICP-OES) je analitička metoda za određivanje tragova metala u uzorku. Nevedena metoda priprada metodama emisijske spektroskopije koja koristi induktivno spregnutu plazmu, najčešće argon, za pobuđivanje atoma i iona u uzorku. Ovom metodom se uzorak pomoću plazme atomizira na temperaturu od 6000°C – 8000°C , a zatim pobuđeni elektroni pri povratku u osnovno stanje emitiraju energiju valne duljine karakteristične za određeni metal koji je prisutan u uzorku [24].

Prije samog mjerenja obavljena je kalibracija instrumenta, te su pripremljene kivete unesene u uređaj preko pneumatskog raspršivača. Radni uvjeti instrumenta su bili:

- plin nosilac: argon;
- aksijalna pozicija plazme;
- snaga: 1,1 Kw;
- protok rashladnog sredstva: 20 L/min;
- tlak raspršivača: 40 psi;
- rad pumpe: 1,0 mL;
- valna duljina za utvrđivanje koncentracije cinka: 213,856 nm;
- valna duljina za utvrđivanje koncentracije bakra: 324,754 nm;
- valna duljina za utvrđivanje koncentracije željeza: 259,94 nm.

Dobiveni podaci obrađeni su računalnim programom Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Rezultati dobiveni istraživanjem izraženi su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija te je granica statističke značajnosti dobivenih rezultata 5% ($p < 0,05$). Dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički, a razlike u izmjeranim koncentracijama obrađene su neparametrijskim Mann-Whitney testom.

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Koncentracija cinka u jetri štakora nakon prepterećenosti željezom u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)

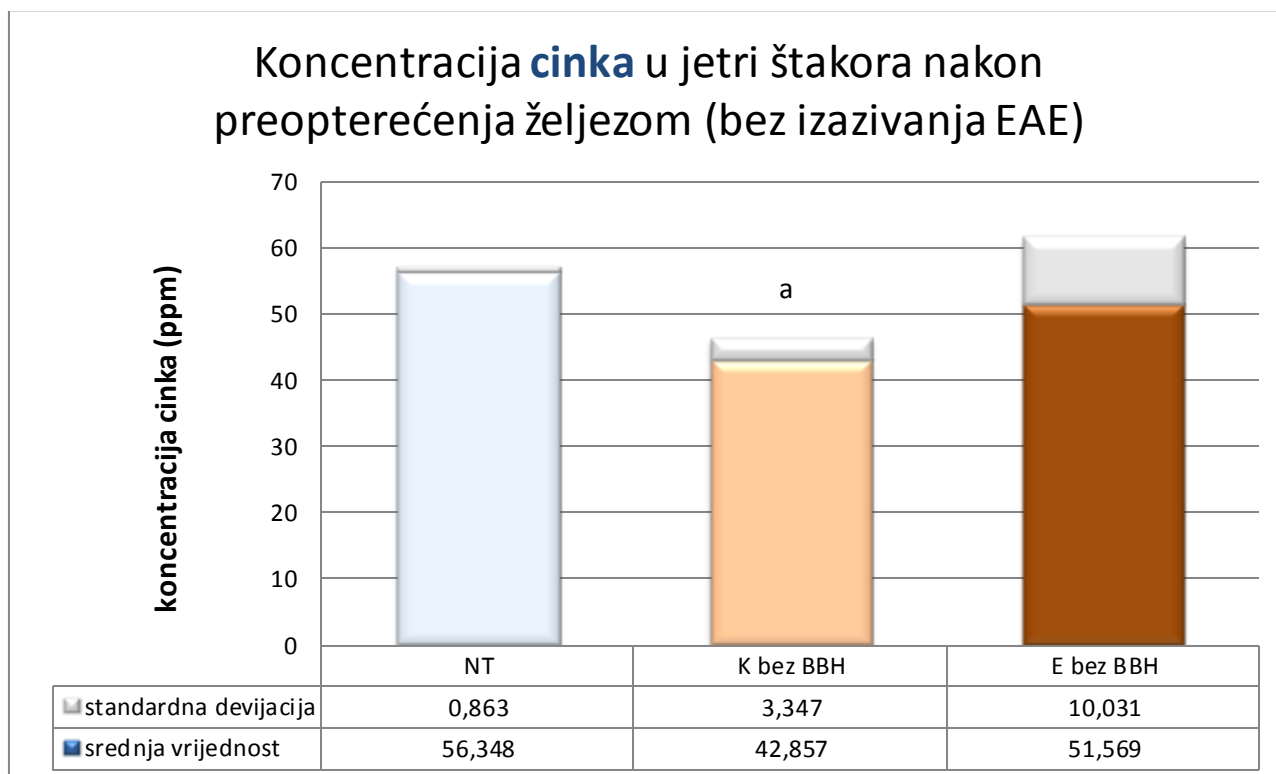
U Tablici 1. prikazani su izmjerene koncentracije cinka na uzorcima jetre netretirane kontrolne skupine (NT), dviju skupina kod kojih je induciran EAE (kontrolne skupine, K i eksperimentalne skupine, E, koja je tretirana željezom) te dvije skupine kod kojih nije bilo indukcije EAE (kontrolne, K bez BBH te eksperimentalne skupine, E bez BBH).

Tablica 1. Izmjerene vrijednosti koncentracije cinka za pojedinačne uzorke navedenih skupina eksperimentalnih životinja zajedno sa izračunatom srednjom vrijednosti te standardnom devijacijom. (sivo označene vrijednosti dio su prethodnih eksperimenata).

metal	NT	K	E	K bez BBH	E bez BBH
Zn	55,789	72,965	66,366	43,075	68,075
Zn	57,433	72,058	50,267	46,807	45,178
Zn	55,535	61,872	53,913	38,620	42,268
Zn	56,637	65,996	82,005	42,929	52,255
Zn		79,931	77,755		50,067
Zn		64,240			
Zn		64,810			
Zn		63,151			
srednja vrijednost	56,348	68,128	66,061	42,857	51,569
standardna devijacija	0,863	6,242	14,036	3,347	10,031

4.2. Usporedba i prikaz koncentracije cinka prema netretiranoj kontrolnoj skupini

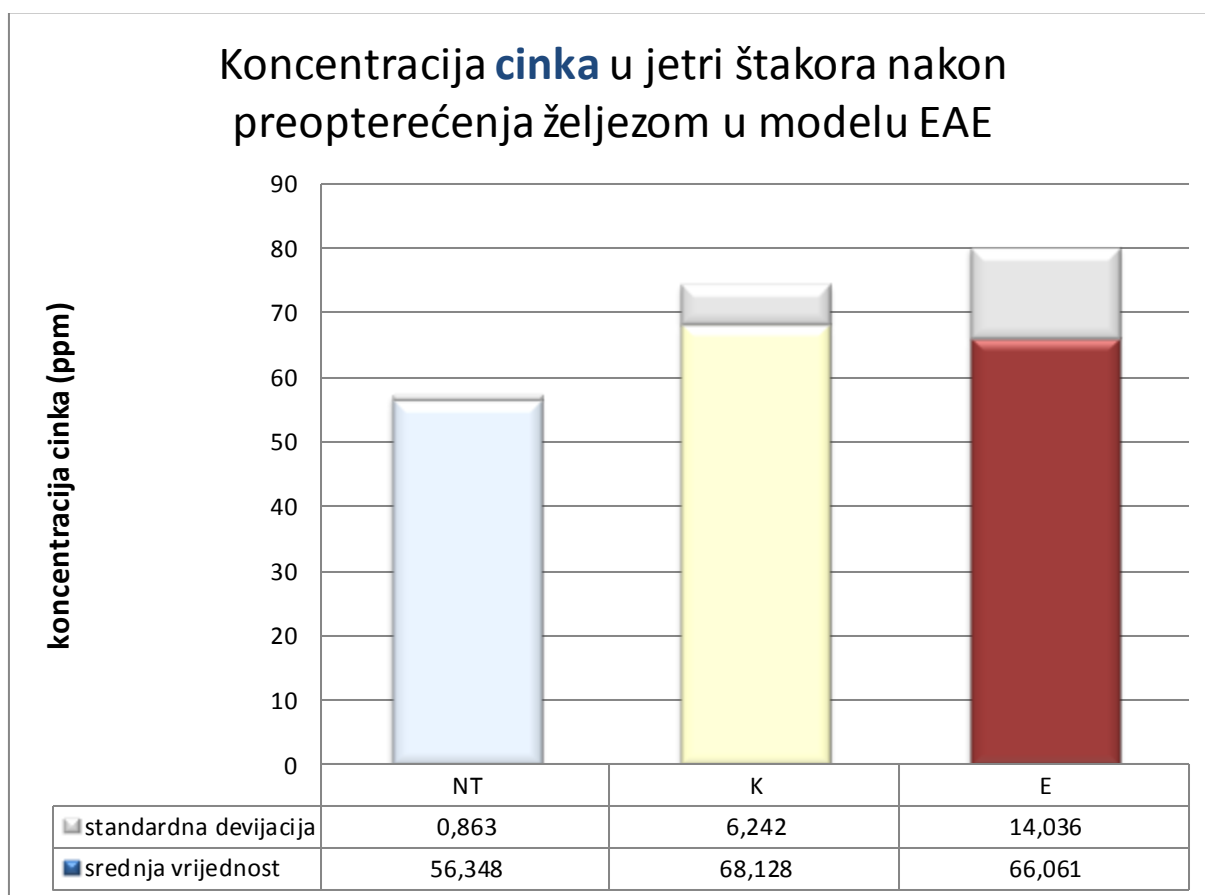
4.2.1. Koncentracija cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom bez primjene modela eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)



Slika 7. Prosječne vrijednosti koncentracije cinka (Zn) u jetri štakora nakon preopterećenja željezom bez izazivanja eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa; netretirana skupina (NT), eksperimentalna skupina bez indukcije EAE (E bez BBH), kontrolna skupina bez indukcije EAE (K bez BBH); a – $p < 0,05$ prema NT skupini.

Iz slike 7. vidimo da je koncentracija cinka statistički značajno niža kod kontrolne skupine bez BBH u odnosu na netretirane eksperimentalne životinje. Skupina tretirana preparatom željeza, ali bez indukcije BBH nije se razlikovala od kontrolnih skupina prema sadržaju cinka.

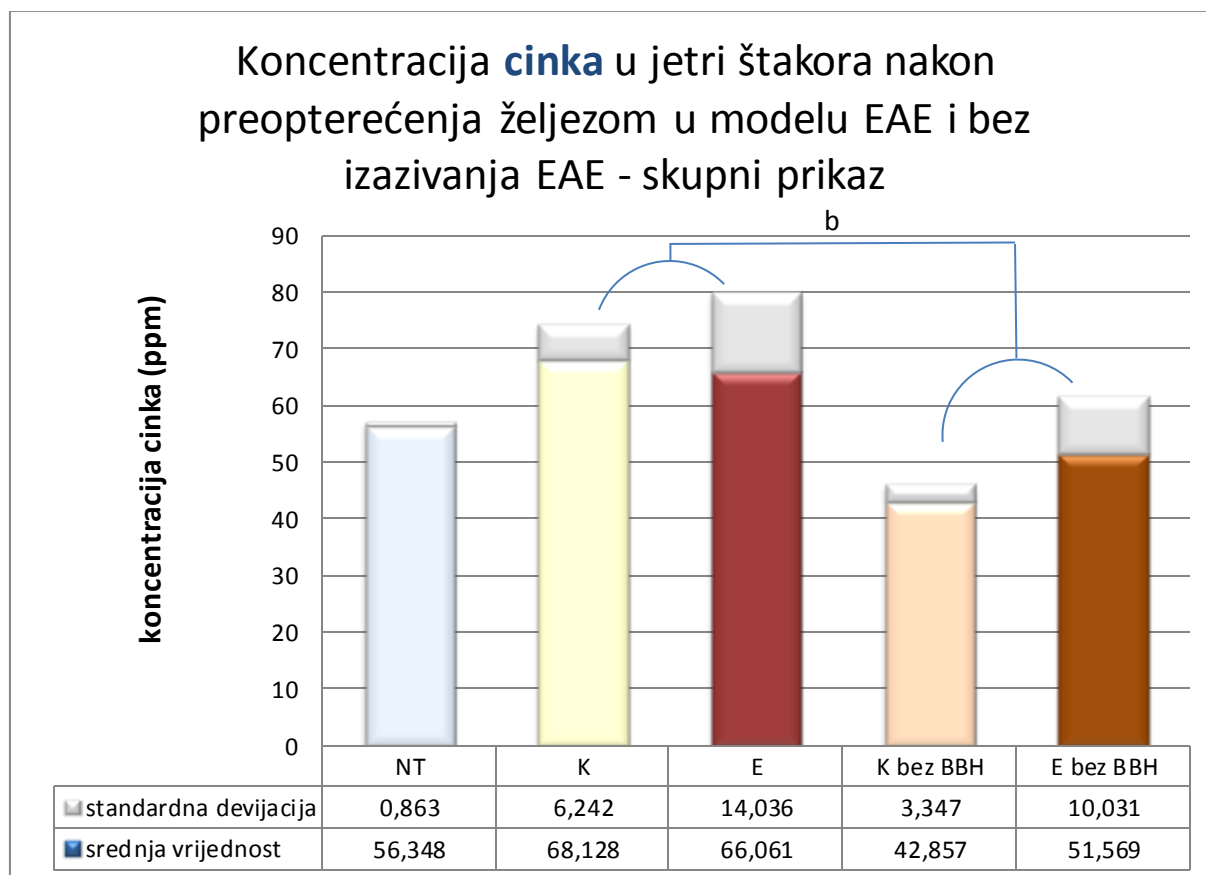
4.2.2. Koncentracija cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom u modelu EAE



Slika 8. Srednje vrijednosti koncentracije cinka nakon preopterećenja željezom u modelu EAE kod netretirane skupine (NT), kontrolne skupine tretirane fiziološkom otopinom (K) i eksperimentalne skupine (E) tretirane željezom

U prethodnim istraživanjima (koja nisu bila tema ovog rada) utvrđeno je da nema statistički značajne promjene koncentracije cinka u jetri nakon preopterećenja željezom u modelu EAE.

4.2.3. Skupni prikaz promjena koncentracije cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom u modelu EAE i bez izazivanja EAE



Slika 9. Prosječne vrijednosti koncentracije cinka (Zn) u jetri štakora nakon preopterećenja željezom, sa i bez izazivanja eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa. Netretirana skupina (NT), kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom (K), eksperimentalna skupina (E) tretirana željezom, eksperimentalna skupina bez indukcije EAE (E bez BBH), kontrolna skupina bez indukcije EAE (K bez BBH); b – $p < 0,05$ skupine bez indukcije prema skupinama s indukcijom EAE.

Iz navedenog grafa vidimo gotovo nepromijenjenu koncentraciju cinka u jetri štakora sa ili bez indukcije EAE nakon preopterećenja željezom. No, statistički značajno veća koncentracija cinka izmjerena je kod skupina s induciranim EAE u odnosu na skupine bez indukcije EAE.

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Uloga cinka je velika u metabolizmu i stoga je logično da dolazi do promjene koncentracije cinka kod poremećaja u organizmu, a disfunkcija homeostaze cinka može dovesti do imunodeficijencije ili pak neuroloških poremećaja. Kod preopterećenja organizma željezom, redoks aktivno željezo može djelovati toksično povećavajući nivo reaktivnih kisikovih vrsta.

5.1. Promjena koncentracije cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom (bez indukcije eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa)

Postoje brojne studije koje uključuju eksperimentalne životinje i pokazuju povezanost metabolizma željeza i ostalih metala u tragovima. Posebice se to odnosi na modele s preopterećenjem željeza. S obzirom na identificirani transporter dvovalentnih metala (DMT1) koji prenosi željezo, ali također cink i mangan, očekuje se povezanost metabolizma navedenih kationa. DMT1 nalazimo u različitim tkivima, ali je različito reguliran u mozgu za razliku od jetre i slezene, pa se mogu očekivati razlike u koncentraciji željeza i cinka u jetri kod modela preopterećenja željezom. Također je pronađeno da stanja koja povisuju apsorpciju željeza (manjak željeza, hemokromatoza) također povisuju i apsorpciju cinka odnosno raste i sadržaj cinka u jetri.

Rezultati iz našeg eksperimenta ukazuju na blagi porast koncentracije (iako nije statistički značajan) cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom, a bez indukcije EAE u odnosu na kontrolnu skupinu predtretiranu samo fiziološkom otopinom.

Cink, za razliku od ostalih metala u tragovima, nema svojstvo da se nakuplja u organizmu pa njegova koncentracija je veoma osjetljiva na promjene ostalih metala koji su u interakciji s njim. U jetri je vezan na metalotioneine i/ili feritin.

U radu Waalkes M.P. i Klaasen C.D. je potvrđeno da željezo može povisiti sadržaj metalotioneina u jetri odnosno ono ima najbrži odgovor na povećanu potrebu za metalotioneinima nakon primanja većih doza različitih metala [25]. Rezultate koji pokrepljuju i ovo istraživanje dobili su i Vayenas D. V. i suradnici u svom istraživanju. Oni su zapazili da se koncentracija cinka kod životinja opterećenih željezom povisila. Svoja zapažanja opravdali su činjenicom da je nakon preopterećenja željeza došlo do povećanja koncentracije metalotioneina i feritina u jetri [26]. Slično objašnjenje dali su Zhang i sur. koji su zaključili da je nakon preopterećenja željezom dolazi do veće ekspresije regulatornih proteina za Fe i Zn te proteina koji sadrže cink (metalotioneini) [27].

Kao što je opisano u poglavljima 1.2.1. i 1.3.1. povećana koncentracija željeza uzrokuje stvaranje slobodnih radikala koji dovode do oksidacijskog stresa. Svaki organizam, u ovom slučaju štakora, trudi se suzbiti oksidacijski stres. Organizam u borbi protiv oksidacijskog stresa potiče povećanu proizvodnju antioksidativnog sustava to jest metalotionein- i superoksid-dismutazu. Upravo, metalotionein- i superoksid-dismutaza u svojoj strukturi sadrže cink, a u patološkom stanju preopterećenja željezom, Fe i superoksidi su u međusobnoj interakciji i to na način da jedan povećava toksičnost drugog [12].

5.2.Promjena koncentracije cinka u jetri štakora nakon preopterećenja željezom u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Postoji puno dokaza koji potvrđuju ulogu metalnih iona u nastajanju ili propagaciji različitih neurodegenerativnih bolesti. Takve bolesti uključuju Parkinsonovu, Alzheimerovu i prionsku bolest između ostalih. Promjene na proteinima uključenima u transport i/ili pohranu redoks aktivnih željeza i bakra te cinka utječu na njihovu homeostazu, a time i na patofiziologiju neurodegenerativnih procesa.

Istraživanje koje su proveli Jakovac i suradnici obuhvatilo je promjenu ekspresije metalotioneina u kroničnom relapsirajućem encefalomijelitisu te promjene u sadržaju cinka, bakra i željeza. Njihovo istraživanje pretpostavilo je da dolazi do povećanja koncentracije cinka i bakra u jetri štakora u modelu kroničnog encefalomijelitisa [28]. To su objasnili povećanom ekspresijom metalotioneina (I+II) koja je regulirana fazama EAE te većim otpuštanjem cinka s MT u fazama naleta bolesti (12. dan i 28. dan nakon imunizacije). U radu Tota i suradnici koji je proučavao promjene koncentracije željeza u različitim fazama EAE pronađeno je nakupljanje željeza te povećan odnos Fe/Zn te Fe/Cu u fazama naleta bolesti. Oba rada ukazala su na važnost željezo-ovisnih mehanizama u propagaciji EAE [13].

Koncentracija cinka je vrlo osjetljiva na promjenu koncentracija ostalih metala koji su interakciji s njim, ali i npr. na prehranu. Analogne rezultate istraživanja dobili su i Troost Freddy J. i suradnici u svom istraživanju. Oni su uočili smanjenu apsorpciju cinka kod muškaraca i žena koji su bili izloženi oralnoj terapiji željeza [29].

Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da se koncentracija cinka ne mijenja nakon preopterećenja željezom uz indukciju EAE u jetri štakora ako gledamo prema kontrolnoj skupini. Ipak, sadržaj cinka je značajno veći kod skupina s induciranim EAE u odnosu na skupine bez indukcije EAE. S obzirom na navedene činjenice vjerojatno se povećanje

koncentracije cinka može pripisati porastu koncentracije metalotioneina u jetri. Imunološki sustav daje odgovor na model EAE te dolazi do antioksidativnih reakcija, npr. i povećane sinteze SOD. Upravo u jetri se stvara bogato imunološko okruženje koje pokušava razviti toleranciju na EAE.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Iz provedenog eksperimenta i rezultata koncentracija cinka u jetri štakora u modelu eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa, dolazimo do sljedećih zaključaka:

- koncentracija cinka u jetri štakora nije se statistički značajno promijenila u odnosu na kontrolnu skupinu kod preopterećenja željezom bez indukcije EAE;
- koncentracija cinka u jetri štakora nije se statistički značajno promijenila u odnosu na kontrolnu skupinu kod preopterećenja željezom uz indukciju EAE;
- u skupinama gdje je induciran EAE nakon preopterećenja željezom, porastao je sadržaj cinka u jetri u odnosu na skupine bez indukcije EAE;

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- [1] Što je multipla skleroza? Dostupno na: www.plivazdravlje.hr/centar/294/Multipla-skleroza.html Pristupljeno: 5.8.2016
- [2] Krajcar N.: Patologija multipla skleroza. Diplomski rad, Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2014
- [3] Bošnjak M.: Akutni demijelinizirajući encefalomijelitis Dostupno na: <https://desetkoms.wordpress.com/2015/10/13/akutni-demijelinizirajuci-encefalomijelitis>
- [4] Gou L., U Y., Li J., Lin H., Ji H., Que L., Zhang Y., Wang J.: Evaluation of a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis with human MBP as antigen. Cellular & Molecular Immunology. 2004.
- [5] 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>
- [6] Valko M., Leibfritz D., Jan Moncol J., T.D. Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007. 39(1): 44–84.
- [7] Oksidacijski stres, slobodni radikali i antioksidansi; Dostupno na: www.belupo.hr/default.a&px?sid=4763
- [8] Bergendi L., Beneš L., Ďuračková Z., Ferenčík M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sciences. 1999. 65(18–19): 1865–1874.

- [9] Helmut S.. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Experimental physiology. 1997. 82(2): 291–5.
- [10] Jekić K. Heterociklički aromatski spojevi. Završni rad. Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku, Odijel za kemiju. Osijek. 2015
- [11] Željezo. Dostupno na : <https://hr.wikipedia.org/wiki/Željezo> Pristupljeno: 29.7.2016
- [12] Đokić M., Bilandžić N. Željezo –toksikološki i nutritivni aspekti u organizmu. Pregledni rad Dostupno na: <http://hrcak.srce.hr/file/133116>
- [13] 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.
- [14] 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
- [15] Cink. Dostupno na: <https://hr.m.wikipedia.org/wiki/Cink>
- [16] 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.
- [17] Valko M., Leibfritz D., Jan Moncol J., T.D. Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007. 39(1): 44–84.

- [18] Fukuda T., Yamasaki S., Nishida K., Murakami M., Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *Jurnal od Biological Inorganic Chemistry*. 2011. 16:1123–1134
- [19] 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.
- [20] Szewczyk B. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2013. 19;5:33.
- [21] Jetra. Dostupno na: <https://hr.m.wikipedia.org/wiki/Jetra> . Pristupljeno: 25.8.2016.
- [22] Jetra-Uloga u organizmu, poremećaji i liječenje. Dostupno na: www.belupo.hr/Default.aspx?sid=12420 Pristupljeno: 25.8.2016
- [23] Dizdar A.M. Mikrovalna i ultrazvučna digestija pepela krutih goriva. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Zagreb. 2012.
- [24] Boss CB., Fredeen KJ. Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Second Edition. Perkin-Elmer Corporation. 1997.
- [25] Waalkes MP, Klaassen CD. Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. *Fundam Appl Toxicol*. 1985. 5(3): 473-7
- [26] 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.

- [27] Zhang Y, Li B, Chen C, Gao Z. Hepatic distribution of iron, copper, zinc and cadmium-containing proteins in normal and iron overload mice. *Biometals*. 2009. 22(2):251-9.
- [28] 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.
- [29] Troost Freddy J., Brummer Robert-Jan M., Dainty Jack R., Hoogewerff Jurian A., Bull V. and Saris W. Iron supplements inhibit zinc but not copper absorption *in vivo* in ileostomy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003. 78(5): 1018-10223.

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime: Filip

Prezime: Cindrić

Kvalifikacije: Učitelj skijanja s IVSI licencom

Redovni student na trećoj godini Preddiplomskog sveučilišnog studija
Sanitarno inženjerstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

Datum rođenja: 12.8.1991

Mjesto rođenja: Ogulin

Adresa stanovanja: Stara cesta 28, Ogulin

Broj telefona: 047 525 228

Broj mobitela: 091 378 6429

E-mail adresa: filip.cindric.7@icloud.com

OBRAZOVANJE

2013. – Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo na
Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

2010. – 2012. Kemijsko tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu

2006. – 2010. Opća gimnazija Bernardina Frankopana, Ogulin

1998. – 2006. Prva osnovna škola, Ogulin

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: A i B kategorija

Sport: Učitelj skijanja s IVSI licencom

OSOBNI INTERESI

Sportske aktivnosti: Član HZUTS-a Ogulin

Član Skijaškog kluba „Bjelolasica Ogulin“

Hobi: skijanje, nogomet, rukomet,