

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Antonio Lukenda i Mario Bažant

ULOGA BAKRA U OBOLJENJIMA ŠTITNE ŽLIJEZDE

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan i predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

SADRŽAJ

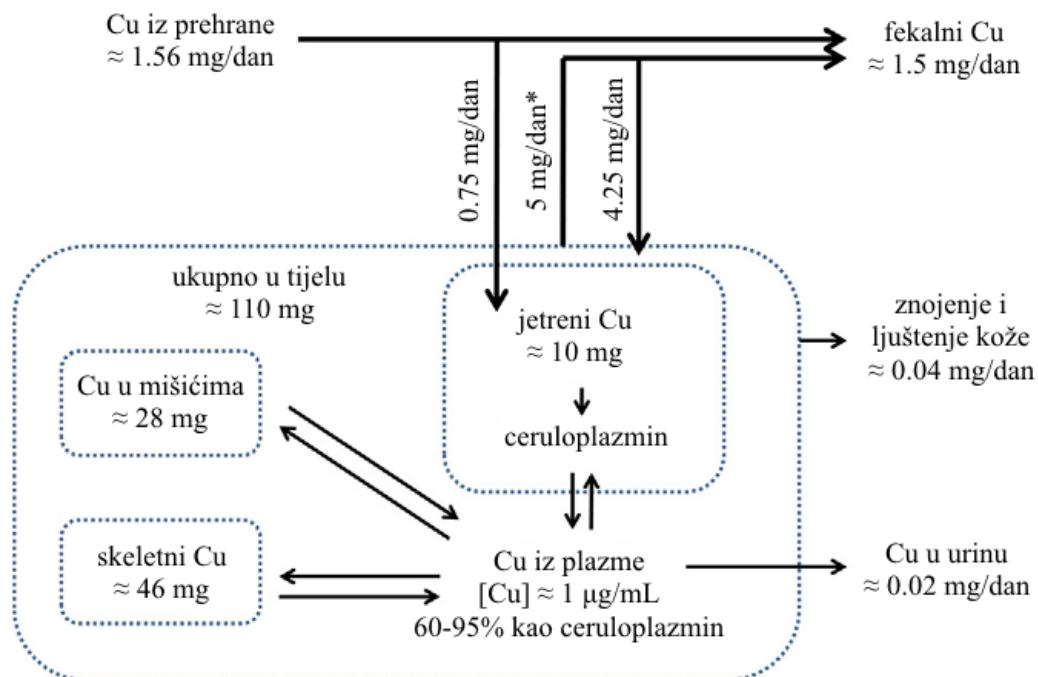
| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Bakar..... | 1 |
| 1.1.1. Funkcije bakra u organizmu | 2 |
| 1.1.2. Praćenje razine bakra u organizmu | 3 |
| 1.2. Oksidacijski stres..... | 3 |
| 1.2.1. Superoksid dismutaza..... | 4 |
| 1.3. Štitna žlijezda | 5 |
| 1.3.1. Sinteza hormona štitne žlijezde..... | 6 |
| 1.3.2. Regulacija lučenja hormona štitne žlijezde | 7 |
| 1.3.3. Fiziološke funkcije hormona štitne žlijezde..... | 8 |
| 1.3.4. Oboljenja štitne žlijezde | 9 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 3.1. Kemikalije | 13 |
| 3.2. Oprema | 13 |
| 3.2.1. Čitač pločica | 14 |
| 3.3. Prikupljanje uzoraka plazme | 14 |
| 3.4. Metode..... | 15 |
| 3.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje bakra | 15 |
| 3.4.1.1. Princip metode | 15 |
| 3.4.1.2. Priprema otopina | 15 |
| 3.4.1.3. Izvođenje pokusa | 18 |
| 3.4.2. Određivanje katalitičke aktivnosti enzima SOD | 18 |
| 3.4.2.1. Princip metode | 18 |
| 3.4.2.2. Priprema otopina | 19 |
| 3.4.2.3. Izvođenje pokusa | 22 |
| 3.5. Statistička obrada rezultata..... | 22 |
| 4. REZULTATI..... | 23 |
| 4.1. Antropološki podaci ispitanika istraživanja | 23 |
| 4.2. Koncentracija bakra | 24 |
| 4.3. Katalitička aktivnost SOD | 27 |
| 5. DISKUSIJA | 29 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 32 |
| 7. LITERATURA | 33 |

| | | |
|-----|-----------------|----|
| 8. | ZAHVALE..... | 35 |
| 9. | SAŽETAK | 36 |
| 10. | SUMMARY | 37 |
| 11. | ŽIVOTOPISI..... | 38 |

1. UVOD

1.1. Bakar

Bakar je kemijski element koji je u niskim koncentracijama potreban za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma te se stoga i naziva esencijalnim. Zdrava odrasla osoba mora dnevno unijeti 1-2 mg bakra u organizam (Bost i sur., 2016). Iz probavnog trakta bakar se apsorbira u želucu i tankome crijevu pomoću različitih transportera. Bakar vezan na albumin i transkuprein pohranjuje se u jetri. Osim u jetrenom parenhimu, bakar nalazimo u raznim tkivima poput sive tvari mozga, miokardu, bubrezima, kostima i noktima (Čvorišćec i Čepelak, 2009). U krvi bakar se prenosi pomoću proteina ceruloplazmina, a ostatak pomoću albumina i histidina. U organizmu ga ukupno imamo oko 100 mg. Raspodjela bakra u organizmu prikazana je na slici 1.



Slika 1. Raspodjela bakra u organizmu (preuzeto iz: Bost i sur., 2016).

1.1.1. Funkcije bakra u organizmu

Bakar u organizmu služi kao katalitički kofaktor i kao strukturna komponenta proteina te ima brojne uloge poput enzimske aktivnosti, prijenosa kisika i staničnog signaliziranja. Bakar je redoks-aktivan element. On u stanici lako mijenja oksidacijsko stanje iz bakra (I) u bakar (II) te tako daje i prihvaća elektrone. Nakon ulaska u stanicu, ioni bakra se vežu na različita mjesta metalotiena, citokrom oksidaze i superoksid dismutaze (SOD) upravo stoga što postoji opasnost da slobodni ioni bakra izazovu oštećenja proteina, DNA i staničnih membrana (Wang i sur., 2010). Bakar je kofaktor prolil kao i lizil hidroksilaze, enzima uključenih u nastanak poprečnih vezova odgovornih za čvrstoću kolagenske uzvojnice. Na taj je način bakar uključen u tvorbu vezivnog tkiva (kapilara, ožiljkastog tkiva i sl.), mišićja i kostiju. Stoga se nedostatak bakra povezuje s povećanjem rizika nastanka koronarnih poremećaja (<https://nutricionizam.com/bakar/> pristupljeno 24.4.2017). Također, bakar je odgovoran za konverziju željeza u feri (Fe^{3+}) oblik u kojem se može transportirati organizmom. Kofaktor je tirozinaze, enzima uključenog u sintezu kožnog pigmenta melanina. Neophodan je za normalan razvoj mozga i živčanog sustava. Uključen je u nastanak mijelina kao i u sintezu neurotransmitera (Guyton i Hall, 2012). Pored toga bakar je i antioksidans, odnosno prisutan je kao kofaktor u mnogim redoks enzimima (Bost i sur., 2016). Primjerice, bakar se nalazi u sastavu SOD, lizil oksidaze, ceruloplazmina i drugih enzima koji sudjeluju u oksidacijsko-redukcijskim procesima (Terres-Martos i sur., 1997). Iz tog razloga nedostatak bakra posljedično smanjuje aktivnost antioksidacijskih enzima u kojima sudjeluje bakar, ali i drugih enzima koji ne sadrže bakar, primjerice katalaze i selen-ovisne glutathionperoksidaze (Uriu-Adams i Keen, 2005).

Za pravilno funkcioniranje organizma potrebna je regulacija koncentracije bakra u organizmu. I nedostatak bakra i njegov višak (tzv. hiperkupremija) dovode do niza poremećaja. Do neravnoteže u koncentraciji bakra u organizmu dovodi ili njegov nepravilni unos (više ili

manje količine) ili neki genetski poremećaj. Wilsonova bolest je genetski poremećaj (nasljeđuje se autosomno recesivno), a rezultira nemogućnošću vezanja bakra za ATPazu. Povećana razina bakra u jetri dovodi do oštećenja jetre. Sljedeći genetski poremećaj je Menkesovo oboljenje (X-vezano recesivno nasljeđivanje) koje dovodi do mutacije transportne ATPaze. Nedostatak bakra dovodi do neželjenih patoloških stanja koja se mogu korigirati odgovarajućim unosom putem prehrane ili raznih suplemenata što mora biti strogo kontrolirano da bi se izbjegla njegova toksičnost kada je prisutan u koncentracijama koje prelaze one potrebne za postizanje njegove biološke uloge (Fraga, 2005).

1.1.2. Praćenje razine bakra u organizmu

U procjeni statusa bakra u organizmu mogu se koristiti direktni biokemijski pokazatelji poput mjerenja same koncentracije bakra u plazmi ili indirektni biokemijski pokazatelji, primjerice mjerenje aktivnosti SOD (Milne, 1994). Kao preporučena metoda za određivanje bakra u serumu predložena je atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS), no osim AAS dostupne su i spektrofotometrijske metode (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Princip spektrofotometrijskih metoda bazira se na specifičnom vezanju bakra za kelator/kromogen pri čemu dolazi do nastanka kompleksa i razvijanja boje čiji intenzitet odgovara koncentraciji bakra te se može pratiti spektrofotometrijski. Takve metode jednostavnije su i dostupnije, ali im je nedostatak manjak specifičnosti. Naime, vrlo često drugi dvovalentni metali reagiraju s kelatorom.

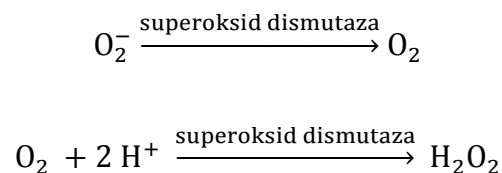
1.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski je stres definiran poremećenom ravnotežom između stvaranja slobodnih radikala i aktivnosti antioksidativnih mehanizama da ih uklone te popravka štete na staničnim elementima uzrokovane štetnim djelovanjem slobodnih radikala. Slobodni su radikali oni spojevi s jednim ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci što rezultira njihovom visokom reaktivnošću. S ciljem popunjavanja valentne ljuske radikali brzo stupaju u interakcije s

mnogim staničnim makromolekulama, primjerice lipidima, proteinima i/ili molekulama DNA, nastojeći im oduzeti elektron/e (Kujundžić i sur., 2003). Neki od slobodnih radikala koji nastaju u ljudskom organizmu su superoksidni radikal (O_2^-), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\cdot}) i hidroksilni radikal (OH^{\cdot}). Stoga što sadrže kisik, nazivamo ih reaktivnim kisikovim vrstama (ROS-ovima) (Čepelak i Dodig, 2003). Pojačano nastajanje ROS-ova povezano je s patogenezom nekih kliničkih stanja. Također, mnoga se stanja i bolesti dovode u izravnu vezu s oksidacijskim stresom: glomerulonefritisi i vaskulitisi različitih etiologija, mnoge autoimunosne bolesti, ateroskleroza, intoksikacija alkoholom, radijacijska oštećenja i karcinomi. Štetno se djelovanje oksidacijskoga stresa očituje poremećajima staničnog metabolizma uključujući prijelom strukture DNA, gubitak fluidnosti stanične membrane, povećanje unutarstaničnog slobodnog kalcija, poremećaje unutarstaničnih signalnih putova, oštećenje membranskih ionskih transportera i proteina, peroksidaciju lipida, ubranu proteolizu te prerano starenje stanice i smrt. Sumarno, dolazi do oštećenja stanica i tkiva na mnogim razinama (Halliwell i sur., 1992).

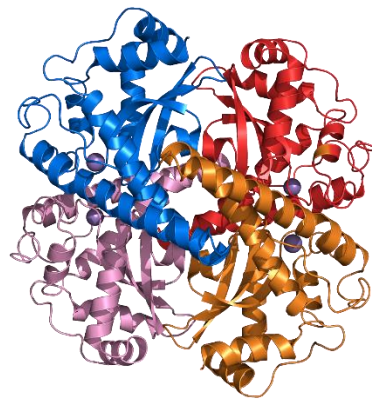
1.2.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) jedan je od važnijih enzima koji sudjeluje u antioksidacijskoj obrani (Slika 2). SOD je enzim koji katalizira prijelaz superoksidnog aniona u molekulski kisik i vodikov peroksid i time priječi, po stanice organizma, štetno oksidacijsko djelovanje superoksidnog aniona (Berg i sur., 2013). Reakcija je prikazana:



Ovisno o metalu u aktivnom središtu enzima i o samoj lokalizaciji enzima u stanici razlikujemo nekoliko tipova SOD. Bakar-cink SOD (CuZn-SOD) u aktivnom mjestu sadrži bakar i cink, a prisutna je u citosolu, jezgri i unutarmembranskom prostoru mitohondrija.

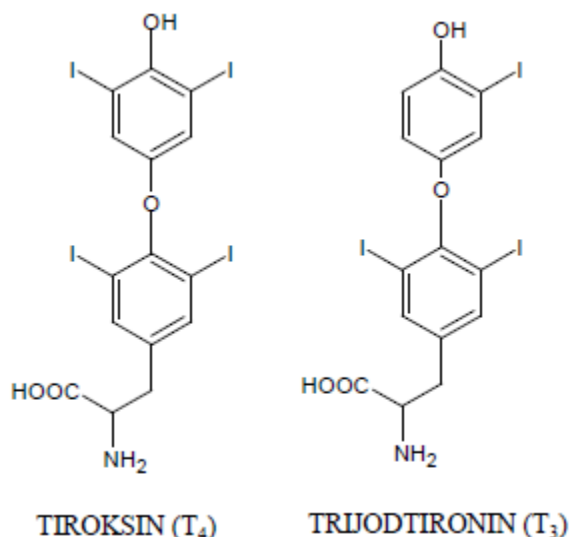
Mangan SOD (Mn-SOD) u aktivnom mjestu sadrži mangan i lokalizirana je u matriksu mitohondrija. Izvanstanična je SOD, koja isto sadrži bakar i cink, prisutna u izvanstaničnim tekućinama i tkivima: u plazmi, limfi, cerebrospinalnoj tekućini itd. Nedostatak bakra, kako je već i spomenuto, utječe na smanjenje aktivnosti CuZn-SOD i posljedično nakupljanje superoksidnog aniona koji oksidativno oštećuje lipide, DNA i proteine u cijelom organizmu (McCord i Fridrovich, 1969; McCord i Fridrovich, 1988; Uriu-Adams i Keen, 2005).



Slika 2. Kristalna struktura SOD (tetramer - svaka podjedinica je označena drugom bojom).

1.3. Štitna žlijezda

Štitnjača je endokrina žlijezda smještena na prednjoj strani vrata, ispod grkljana, a sa strane i ispred samog dušnika. Građena je od lijevog i desnog režnja međusobno povezanih poprečnim tračkom. Izrazito je dobro prokrvljena (Jalšovec, 2013). U odraslih teži od 15 do 20 g što je čini jednom od najvećih endokrinih žlijezda u organizmu. Glavni hormoni vezani uz štitnjaču su tiroksin (T_4) i trijodtironin (T_3) čija je kemijska struktura prikazana na slici 3.

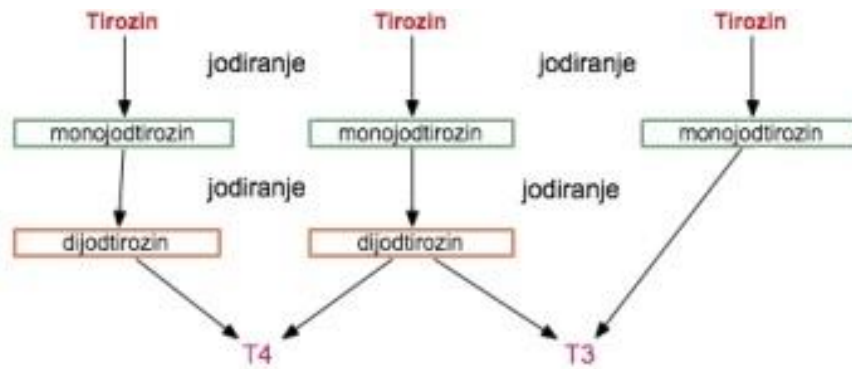


Slika 3. Kemijska struktura hormona štitnjače T₄ i T₃.

1.3.1. Sinteza hormona štitne žlijezde

Za sintezu hormona štitnjače (prikazanu na slici 4) i to prvenstveno T₄, neophodan je jod. Nakon što se apsorbiraju iz probavnoga sustava u krv, jodidi se simportom s natrijem prebacuju u stanice štitnjače gdje se koriste za sintezu hormona štitnjače. Jodid se oksidira u elementarni jod uz pomoć peroksidaze i vodikova peroksida kao reducensa. Ta ista peroksidaza katalizira i spajanje oksidiranog joda s tireoglobulinom, točnije tirozinom, aminokiselinom u njegovu sastavu. Tireoglobulin je velik glikoprotein kojega luče epitelne stanice štitnjače. Tirozin se jodira u monojodtirozin i ponovno u dijodtirozin nakon čega dolazi do međusobnog povezivanja više jodtirozinskih ostataka. Glavni je proizvod toga niza reakcija hormon T₄ nastao spajanjem dviju molekula dijodtirozina. T₃ pak nastaje spajanjem monojodtirozina s jednom molekulom dijodtirozina. Štitnjača je posebna po tome što ima sposobnost pohraniti sintetizirane hormone u svojim folikulima. Tek kada se ukaže potreba za njima, sintetizirani se hormoni proteazama otcjepljuju od molekula tireoglobulina te se tako slobodni otpuštaju u krv. Po završetku sinteze hormona štitnjače, svaka molekula tireoglobulina sadrži i do 30 molekula T₄ i nekoliko molekula T₃. Zanimljivo je da otprilike četvrtina jodiranog tirozina u

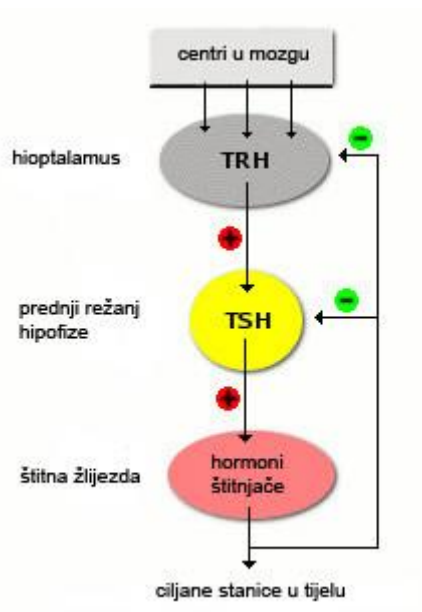
tireoglobulinskoj molekuli nikada ne postane hormonom štitnjače, već ostaje u obliku molekula mono- i dijodtirozina. Enzim dejodaza je taj koji otcjepljuje tako „pohranjen“ jod i predaje ga štitnjači na raspolaganje za stvaranje dodatnih količina hormona (Guyton i Hall, 2012).



Slika 4. Shematski prikaz sinteze T₄ i T₃ (preuzeto iz: http://www.perpetuum-lab.com.hr/uploads/monthly_12_2012/ccs-1-0-08933400-1356397581_thumb.png).

1.3.2. Regulacija lučenja hormona štitne žlijezde

Lučenje hormona štitnjače nadzire se povratnom spregom preko hipotalamusa i adenohipofize. Tireotropin (TSH) iz adenohipofize povećava lučenje hormona štitnjače aktivacijom drugog glasnika, cikličkog adenzin-monofosfata (cAMP), na više načina: povećava proteolizu tireoglobulina kako bi slobodni T₄ i T₃ mogli biti izlučeni u krv, povećava rad jodidne pumpe i jodiranje tirozina te povećava broj samih stanica štitnjače. Lučenje se pak TSH iz adenohipofize nadzire iz hipotalamusa hormonom koji oslobađa tireotropin (TRH). TRH izravno potiče žljezdane stanice adenohipofize na povećano lučenje TSH. Pri povećanju koncentracije hormona štitnjače u tjelesnim tekućinama negativnom se povratnom spregom fiziološki smanjuje lučenje TSH i adenohipofize i time prekida daljnja stimulacija lučenja hormona štitnjače (Guyton i Hall, 2012). Regulacija lučenja hormona štitnjače prikazana je na slici 5.



Slika 5. Regulacija lučenja hormona štitnjače (preuzeto s

http://www.cybermed.hr/var/cybermed/storage/images/media/images/kontrola2/1434-1-cro-HR/kontrola2_large.jpg).

1.3.3. Fiziološke funkcije hormona štitne žlijezde

Receptori za hormone štitnjače nalaze se u jezgri stanica neposredno uz lance DNA. Oni imaju vrlo visok afinitet za T₄. Iz tog se razloga po ulasku T₄ i T₃ u ciljne stanice djelovanjem jodaza uklanja molekula joda sa gotovo svake molekule T₄ te nastaje T₃. Vezanjem s receptorima u jezgri receptori se aktiviraju i započinju proces transkripcije. Posljedično nastaje vrlo velik broj proteina najrazličitijih učinaka na ljudski organizam. Potiču se rast, razvoj središnjeg živčanog sustava, povećavaju se srčani minutni volumen i kontraktilnost srca, ubrzava se disanje i sl. U metaboličkom smislu, povećava se iskorištavanje hranjivih tvari za dobivanje energije, pojačana je aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaza, povećava se intenzitet bazalnog metabolizma, ubrzane su glukoneogeneza, glikogenoliza i lipoliza (Guyton i Hall, 2012).

1.3.4. Oboljenja štitne žlijezde

Bolesti štitne žlijezde karakterizirane su kvalitativnim i kvantitativnim promjenama lučenja hormona i/ili povećanjem štitnjače (vidljivo kao guša). Nedostatno lučenje hormona štitnjače vodi hipotireozu i usporenosti cjelokupnog organizma dok pojačano lučenje rezultira hipertireozom i ubrzanošću metabolizma. Tumori najčešće uzrokuju lokalizirano povećanje štitne žlijezde. Funkcija štitne žlijezde određuje se mjerenjem vrijednosti T3, T4 i TSH u krvnoj plazmi. Niske koncentracije T3 i T4 u cirkulaciji u kombinaciji s porastom lučenja TSH karakteristična su slika nedostatne funkcije štitnjače. S druge pak strane, prekomjerna funkcija štitnjače rezultira povišenim koncentracijama T3 i T4 u cirkulaciji kao i posljedično smanjenim izlučivanjem TSH (Kujundžić i sur., 2003).

Papilarni karcinom štitnjače (lat. *Ca papillare glandulae thyreoideae*) najčešći je karcinom štitne žlijezde i čini 70% svih malignih neoplazija štitnjače. Histološki slični tkivu štitnjače od kojega nastaje. Ionizirajuće je zračenje čest uzročni faktor nastanka ovoga tipa karcinoma. (<http://tumori.me/zlocudni-tumori-stitnjace/> pristupljeno 20. 4. 2017.) Žene od njega obolijevaju dva do tri puta češće od muškaraca te je učestaliji u osoba mlađe životne dobi. Širi se organizmom putem limfe. Kirurško liječenje gotovo uvijek dovodi do izliječenja te se hormoni štitnjače primjenjuju u dozama koje suprimiraju lučenje TSH kako bi se smanjila mogućnost recidiva bolesti (http://www.cybermed.hr/centri_a_z/rak_stitne_zlijezde/papilarni_rak_stitne_zlijezde pristupljeno 20.4.2017.).

Folikularni adenom (benigna neoplazija) štitnjače (lat. *adenoma folliculare*) dobroćudna je i učajurena novotvorina građena od folikularnih stanica folikula štitnjače. Svojim nastankom i rastom vrši pritisak na okolne strukture. Bolest se očituje kao povećanje cijele štitnjače ili u obliku čvorića. Liječi se kirurški (<http://perpetuum->

lab.com.hr/wiki/plab_wiki/patologija/folikularni-adenom-stitnjaee-r213/ pristupljeno 20. 4. 2017.).

Struma (guša, lat. *struma colloidis nodularis*) povećanje je štitnjače koje u pravilu nije udruženo s funkcionalnim, upalnim niti neoplastičnim promjenama. Posljedica je hipertrofije i hiperplazije folikularnog epitela štitnjače. Izazvana je nekim od poremećaja koji koče proizvodnju hormona štitnjače: nedostatnim unosom joda u pojedinim dijelovima svijeta (endemska gušavost), kemikalijama ili je pak nepoznate etiologije (idiopatski tip). Osmam je puta češća u žena, nego u muškaraca. Karakterističan izgled guše nastaje zbog lokalnog pritiska povećane štitnjače na okolne strukture, posebice na gornju šuplju venu što dovodi do zastoja krvi u glavi i licu. Guša, također, sama može proizvoditi višak hormona (toksična guša) te se javljaju simptomi hipertireoze, dok se kod netoksične guše javljaju simptomi hipotireoze (Gamulin, Marušić, Kovač i sur., 2005).

Hashimotov tiroiditis autoimuna je upalna bolest štitnjače kroničnoga tijeka. Češća je u žena srednje životne dobi. Bolest je karakterizirana infiltracijom štitnjače limfocitima i nalazom povećane vrijednosti protutijela na nekoliko komponenti tkiva štitnjače. Najvažniju ulogu igraju protutijela na tireoglobulin i protutijela na tireoidnu peroksidazu. Napredovanjem bolesti može se razviti hipotireoza jer zbog kroničnoga tijeka bolesti dolazi do progresivne zamjene tkiva štitnjače limfocitima i fibroznim tkivom (Kujundžić i sur., 2003).

Zabrinjavajući je podatak da se u posljednjih desetak godina pojavnost oboljenja štitne žlijezde povećala u Republici Hrvatskoj za oko 60%. Prema dostupnim podacima Registra za rak, Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo, od 2001. do 2012. godine broj novooboljelih od raka štitnjače (ICD-10 oznaka C73) ukupno je porastao za 60,74%. Najčešće se radi o papilarnim karcinomima, benignim neoplazijama, strumama ili o autoimunom poremećaju – Hashimotovu tiroiditisu. Registar za rak, Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo od 1962. godine prikuplja podatke o novooboljelima i umrlima od raka, od 1994. godine punopravni je

član Međunarodne udruge registara za rak te su podaci Registra uključeni u najveću svjetsku bazu o incidenciji, prevalenciji i mortalitetu GLOBOCAN. Podaci unutar Registra klasificirani su prema desetom izdanju Međunarodne klasifikacije bolesti (*International Classification of Diseases, ICD-10*), Svjetske zdravstvene organizacije (WHO).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Štitna žlijezda endokrini je organ koji sintetizira hormone T_4 i T_3 koji su važni u kontroli metabolizma organizma. U posljednjih se desetak godina u Republici Hrvatskoj pojavnost oboljenja štitne žlijezde povećala za oko 60%. Unatoč brojnim istraživanjima, etiološki čimbenici nastanka oboljenja štitne žlijezde nisu još razjašnjeni. Bakar je esencijalni element u tragovima. U organizmu je sastavni dio brojnih proteina pa tako i enzima te ima ulogu održavanja homeostaze organizma i zaštite od oksidacijskoga stresa. Uloga bakra u nastanku oboljenja štitne žlijezde do sada je slabo istraživana.

Cilj ovoga istraživanja je ispitati ulogu bakra u nastanku oboljenja štitne žlijezde.

Specifični ciljevi ovoga istraživanja su:

- 1) Sakupiti uzorke plazme pacijenata oboljelih od bolesti štitne žlijezde i zdravih pojedinaca (kontrolna skupina) te u njima odrediti razina bakra, a kako bi se utvrdilo da li postoji razlika u razini bakra između skupine oboljelih od bolesti štitne žlijezde i kontrolne skupine;
- 2) S obzirom da je SOD enzim koji sudjeluje u obrani od oksidacijskog stresa te je u njegovom aktivnom mjestu bakar, u ovome istraživanju odrediti će se u plazmi oboljelih od bolesti štitne žlijezde kao i u kontrolnoj skupini katalitička aktivnost enzima SOD s ciljem da se utvrdi da li je aktivnost SOD različita u dvije ispitivane skupine;
- 3) Također usporediti će se izmjerena razina bakra i katalitička aktivnost SOD kako bi se mogla utvrditi moguća povezanost ova dva parametra kako kod zdravih pojedinaca tako i kod oboljelih od bolesti štitnjače.

Dobiveni rezultati trebali bi dati uvid u ulogu bakra i antioksidacijskog enzima SOD u nastanku oboljenja štitne žlijezde.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

U ovome istraživanju korištene su kemikalije:

- standard bakra (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, SAD)
- 5-brom-2-piridilazo-N-propil-N-sulfopropil-amilo-anilin, 5-Br-PSAA (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, SAD)
- gvanidin hidroklorid, gvanidin HCl (Sigma-Aldrich Co, St.Louis, SAD)
- natrij acetat (Kemika, Zagreb)
- octena kiselina (Kemika, Zagreb)
- komercijalni kit za određivanje katalitičke aktivnosti enzima SOD (Cayman Chemical (Missouri, SAD)

Sve korištene kemikalije bile su *p.a.* čistoće. Za pripremu otopina korištena je MilliQ voda.

3.2. Oprema

Korištena oprema uključuje:

- centrifuga (Eppendorf, Njemačka)
- mješalica/vortex, Ika vortex (Ika, Njemačka)
- spektrofotometar A Agilent 8453 UV-Vis (Agilent Technologies, CA, SAD)
- čitač pločica Wallac 1420 Viktor 2 (PerkingElmer, USA)

3.2.1. Čitač pločica

Čitač pločica je uređaj koji detektira biološka, kemijska ili fizikalna svojstva u otopinama koje se nalaze u bunarićima na mikrotitarskoj pločici. Od spomenutih svojstava može mjeriti apsorbanciju, intenzitet fluorescencije i luminescenciju ovisno o modelu uređaja. Izvor svjetlosti određene valne duljine se usmjerava kroz bunariće na mikrotitarskoj pločici te se s druge strane mjeri intenzitet svjetlosti koji se uspoređuje s početnim intenzitetom i dobiva se brojčana vrijednost, tj. apsorbancija. Za dobivanje svjetlosti točno određene duljine koriste se filteri ili monokromator.

3.3. Prikupljanje uzoraka plazme

Uzorci plazme oboljelih od štitne žlijezde sakupljeni su u suradnji s liječnicima bolnice KBC Sestre milosrdnice. Pored tih uzoraka sakupljeni su i uzorci plazme osoba koje su predstavljale kontrolnu skupinu. Kontrolnu skupinu činili su zdravi ispitanici koji su po spolu, dobi i konzumiranju duhanskih proizvoda odgovarali oboljelim ispitanicima. U populaciju oboljelih osoba uključene su osobe kojima je dijagnosticiran papilarni karcinom, folikularni adenom te ostala oboljenja štitne žlijezde poput strume i Hashimotova tireoiditisa.

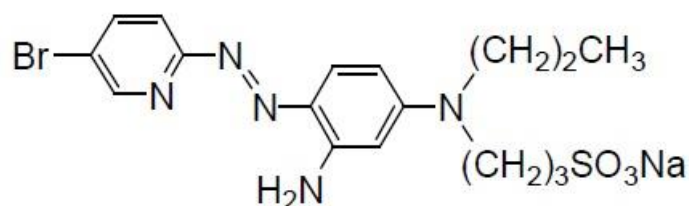
Prije samog istraživanja pribavljena je potvrda Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (broj: EP-717/13-14 iz 24.1.2013. godine) kao i potvrda Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Čitavo je istraživanje provedeno u skladu sa svim važećim i primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju. Svaki ispitanik prije sudjelovanja u ovom istraživanju obavješten je o detaljima istraživanja te je potpisao suglasnost o sudjelovanju u istraživanju uz prava na: anonimnost ispitanika u istraživanju, uvid u sve svoje rezultate istraživanja, odustajanje iz istraživanja u bilo kojem trenutku bez obaveze objašnjavanja razloga odustajanja.

3.4. Metode

3.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje bakra

3.4.1.1. Princip metode

Za određivanje koncentracije bakra u plazmi korištena je spektrofotometrijska metoda. Princip metode je reakcija u kojoj se bakar veže s kelatorom 5-Br-PSAA (5-brom-2-piridilazo-N-propil-N-sulfopropil-amilo-anilinom, slika 6.) pri čemu nastaje crveni kompleks čiju je koncentraciju moguće odrediti spektrofotometrijski mjereći apsorbanciju pri valnoj duljini od 580 nm (Makino, 1989). Naime pri pH 4,2 dvovalentni bakar uz dodatak guanidin hidroklorida odvaja se od proteina i veže s kromogenom 5-Br-PSAA. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji bakra u uzorku. Koncentracija bakra određena je iz baždarnog pravca i izražena u $\mu\text{g/mL}$.



Slika 6. Kelator korišten za spektrofotometrijsko određivanje bakra, 5-Br-PSAA.

3.4.1.2. Priprema otopina

Radni reagens za određivanje bakra sastojao se od gvanidin HCl i kromogena 5-Br-PSAA.

Priprema acetatnog pufera

Odvagano je 7,08 g Na-acetata te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 1 litre. Zatim je dodano 18,025 mL octene kiseline te je odmjerna tikvica nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina imala je koncentraciju 0,4 mol/L i pH 4,2.

Priprema gvanidin HCl

Odvaga gvanidin HCl od 477,65 g se kvantitativno prenijela u odmjernu tikvicu od 1 litre te je nadopunjena do oznake s prethodno pripremljenim acetatnim puferom koncentracije 0,4 mol/L, pH 4,2. Ta je otopina imala koncentraciju 5 mol/L gvanidin HCl.

Priprema otopine 5-Br-PSAA

Otopina 5-Br-PSAA pripremljena je vaganjem 47,834 g 5-Br-PSAA, odvaga se kvantitativno prenijela u odmjernu tikvicu od 1 litre te nadopunila destiliranom vodom kako bi se dobila otopina koncentracije 0,1 mol/L.

Radni reagens pripremio se tako što su se otopina gvanidin HCl u acetatnom puferu i otopina 5-Br-PSAA pomiješale u omjeru 1:1.

Priprema standardnih otopina bakra

Iz matične otopine bakra koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ (pripremljene u 10 % HNO_3) napravljena su serijska razrjeđenja standarda bakra u rasponu koncentracija 0,5 – 5,0 $\mu\text{g/mL}$ u destiliranoj vodi. Ti standardi korišteni su za izradu baždarnog pravca. Postupak pripreme standarda i njihove koncentracije prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Koncentracije i priprema standardnih otopina bakra.

| koncentracija standardne otopine bakra ($\mu\text{g/mL}$) | postupak pripreme standarda | ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu |
|---|---|--|
| 0,5 | 0,5 mL matične otopine nadopunjeno destiliranom vodom do 10 mL | 20 x |
| 1,0 | 1,0 mL matične otopine nadopunjeno destiliranom vodom do 10 mL | 10 x |
| 2,0 | 2,0 mL matične otopine nadopunjeno destiliranom vodom do 10 mL | 5 x |
| 5,0 | 5,0 mL matične otopine nadopunjeno destiliranom vodom do 10 mL | 2 x |

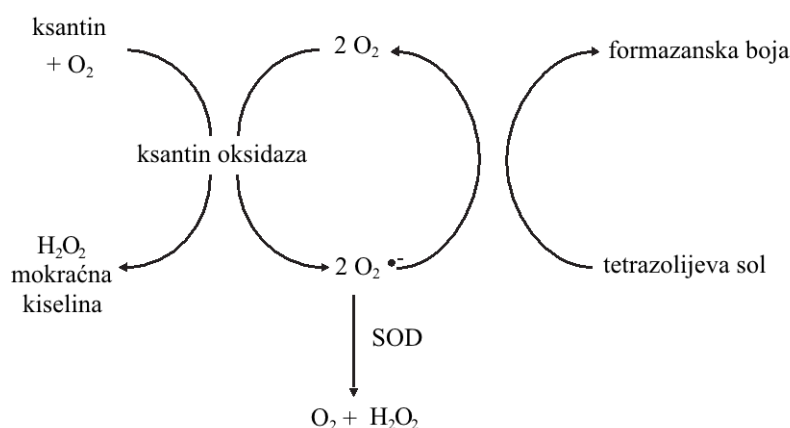
3.4.1.3. Izvođenje pokusa

Uzorci plazme prethodno su centrifugirani 5 minuta na 2000 g. Nakon centrifugiranja, 0,10 mL bistrog nadsloja prebačeno je u novu Eppendorf epruvetu te se na njega dodao 1,0 mL radnog reagensa (radni reagens čine guanidin HCl i kromogen 5-Br-PSAA, 1:1). Uz uzorke pripremljene su slijepa proba i standardi. Slijepa proba reagensa pripremljena je dodavanjem 0,10 mL destilirane vode u 1,0 mL radnog reagensa. Standardi su pripremljeni dodavanjem 0,10 mL standarda bakra (raspon koncentracija 0,5 – 5,0 µg/mL) u 1,0 mL radnog reagensa. Apsorbancije su mjerene odmah (bez inkubacije) na spektrofotometru pri 580 nm. Koncentracija bakra određena je iz baždarnog pravca i izražena u µg/mL.

3.4.2. Određivanje katalitičke aktivnosti enzima SOD

3.4.2.1. Princip metode

Za određivanje aktivnosti SOD korišten je komercijalno dostupan test komplet proizvođača Cayman Chemical (Missouri, SAD). Test komplet koristi tetrazolijevu sol za detekciju superoksidnih radikala. U reakciji se tetrazolijeva sol reducira u formazansku boju koja apsorbira svjetlost valne duljine 450 nm, a superoksidni radikali se oksidiraju u molekularni kisik. Nastali molekularni kisik se ksantin oksidazom pretvara u superoksidni radikal, a nastali nusprodukti su vodikov peroksid i mokraćna kiselina (slika 7). Nastali superoksidni radikal može ponovno reducirati tetrazolijevu sol u boju. Kako SOD prevodi superoksidni radikal u H₂O₂ i O₂, tako se obojenje sve manje i manje povećava i u beskonačnosti dostiže stalnu vrijednost, tj. ne mijenja se. Drugim riječima, kod manje koncentracije SOD u uzorku, više će boje nastati jer nema „dovoljno SOD“ za prevoditi nastali superoksidni radikal u kisik i peroksid pa on reducira tetrazolijevu sol.



Slika 7. Princip određivanja katalitičke koncentracije SOD u plazmi.

3.4.2.2. Priprema otopina

Komercijalni kit sadržavao je sljedeće otopine: pufer za probe (*assay buffer*, 5 mL), pufer za uzorke (*sample buffer*, 5 mL), detektor (*radical detector*, 250 μ L), standard SOD (100 μ L) i ksantin oksidazu (150 μ L).

Priprema pufera za probe *assay buffer*

Dobiveni koncentrat pufera za probe razrijeđen je 10 puta s MilliQ vodom. Zbog količine pufera potrebne za izvođenje pokusa razrijedilo se 3 mL pufera za probe iz kita s 27 mL MilliQ vode da bi konačno razrjeđenje bilo 10 puta. Konačna otopina imala je pH 8,0 i sadržavala je 50 mM Tris-HCl, 0,1 mM dietilentriaminpentaoctenu kiselinu i 0,1 mM hipoksantina. Ovako pripremljen pufer za probe (10x) korišten je za pripremu i razrjeđivanje otopine detektora.

Priprema pufera za uzorke *sample buffer*

Dobiveni koncentrat pufera za uzorke razrijeđen 10 puta s MilliQ vodom, tj. u 2 mL koncentrata dodano je 18 mL MilliQ vode. Konačna otopina sadržavala je 50 mM Tris-HCl

puferiranog na pH 8,0. Ovako pripremljena otopina pufera za uzorke (10x) korištena je za pripremu standarda SOD i za razrjeđivanje ksantin oksidaze i uzoraka.

Priprema otopine detektora (tetrazolijeve soli)

Dobiveni koncentrat tetrazolijeve soli razrijeđen je 400 puta s prethodno pripremljenim puferom za probu (10x), tj. 50 µL koncentrata je dodano u 19,95 mL pufera za probu. Tako pripremljena otopina detektora stabilna je 2 sata.

Priprema ksantin oksidaze

Dobiveni koncentrat ksantin oksidaze razrijeđen je 40 puta s prethodno pripremljenim puferom za uzorke (10x), tj. 50 µL koncentrata je dodano u 1,95 mL pufera za uzorke. Ovako pripremljena otopina stabilna je jedan sat.

Priprema standarda SOD

Dobiveni koncentrat standarda SOD razrijeđen je 100 puta s prethodno pripremljenim puferom za uzorke (10x), tj. 20 µL koncentrata dodano je u 1,98 mL pufera za uzorke. Iz tako pripremljene matične otopine SOD aktivnosti 0,25 U/mL pripremljeni su standardi konačne aktivnosti 0,00; 0,01; 0,03 i 0,05 U/mL.

Postupak razrjeđivanja matične otopine SOD:

Iz otopine SOD standarda iz test kompleta, katalitičke aktivnosti 0,25 U/mL priređeni su standardi katalitičkih aktivnosti u rasponu 0,00-0,05 U/mL u puferu za uzorke kao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Katalitičke koncentracije i priprema standardnih otopina SOD.

| katalitička koncentracija standardne otopine SOD (U/mL) | postupak pripreme standarda | ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu |
|--|--|--|
| 0,00 | pufer za uzorak volumena 1000 μ L | - |
| 0,01 | 40 μ L matične otopine nadopunjeno puferom za uzorak do 1000 μ L | 25 x |
| 0,03 | 120 μ L matične otopine nadopunjeno puferom za uzorak do 1000 μ L | 8,33 x |
| 0,05 | 200 μ L matične otopine nadopunjeno puferom za uzorak do 1000 μ L | 5 x |

3.4.2.3. Izvođenje pokusa

U bunariće na mikrotitarskoj pločici dodano je 200 μL pripremljenog detektora, tj. tetrazolijeve soli. Nakon detektora u bunarić je dodano 10 μL uzorka ili standarda. Nakon što su se u bunariću nalazili detektor i uzorak (ili standard), reakcija se pokrenula dodatkom 20 μL ksantin oksidaze, a pločica se lagano promiješala i pokrila poklopcem za pločicu. Reakcija se odvijala 30 minuta (vrijeme inkubacije), a za to vrijeme se nalazila na miješalici na sobnoj temperaturi. Nakon isteklih 30 minuta inkubacije, apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini 450 nm.

3.5. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Rezultati koncentracije bakra i aktivnosti SOD-a između dviju skupina (kontrolna skupina i skupina oboljelih od bolesti štitne žlijezde) zbog malog broja uzoraka uspoređeni su pomoću neparametrijskog testa Mann-Whitney U testa. Usporedba (korelacija) izmjerenih koncentracija bakra i katalitičke aktivnosti SOD napravljena je pomoću Spearmanovog testa korelacije (Spearmanov koeficijent korelacije). Za statističku obradu podataka korišten je program Statistica Version 6.0 (StatSoft Inc. 1984-2011, USA). Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Antropološki podaci ispitanika istraživanja

Za ovo istraživanje prikupljena su, u suradnji s liječnicima KBC Sestre milosrdnice, 24 uzorka plazme oboljelih od bolesti štitne žlijezde. Od tog broja u 12 pacijenata (50%) dijagnosticiran je papilarni karcinom, u 6 pacijenata (25%) folikularni adenom (benigna neoplazija štitne žlijezde) te u preostalih 6 pacijenata (25%) ostala oboljenja štitnjače poput strume i Hashimotova tiroiditisa. Pored toga sakupljeni su i uzorci plazme zdravih ispitanika koji su po spolu, dobi i konzumiranju duhanskih proizvoda odgovarali oboljelim ispitanicima te su služili kao kontrolna skupina. Antropološki podaci sudionika istraživanja prikazani su tablicom 3.

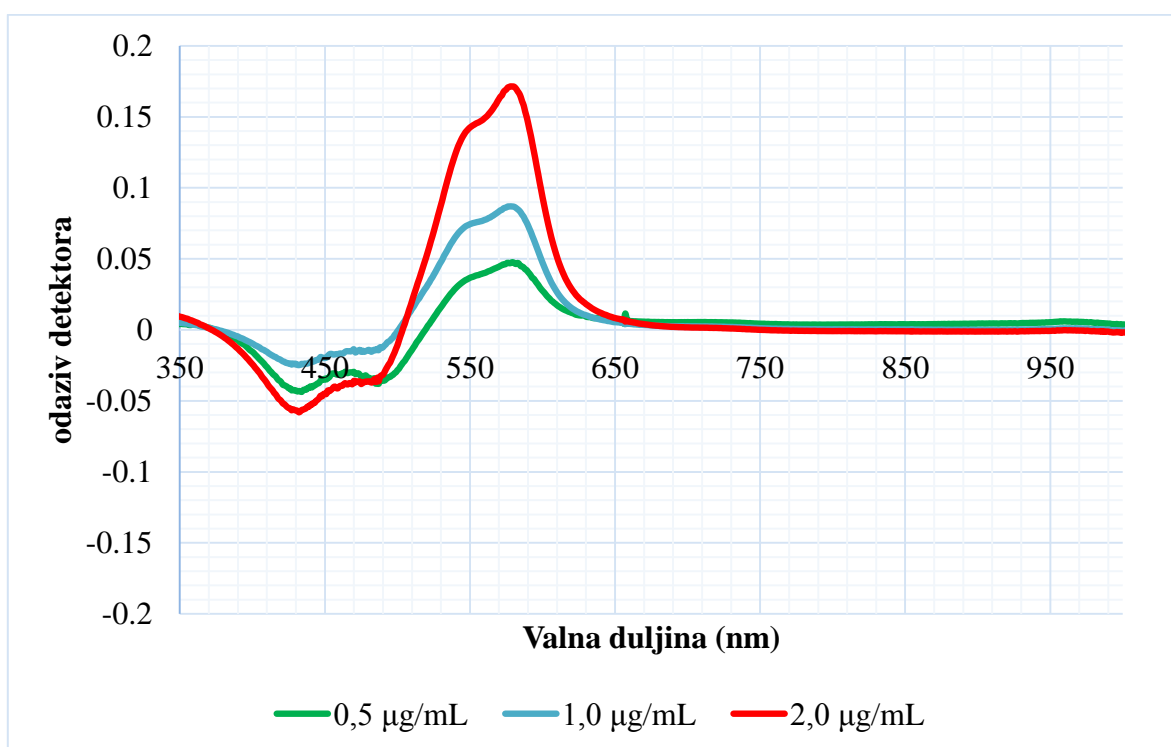
Tablica 3. Antropološki podaci ispitanika istraživanja.

| PARAMETAR | ZDRAVA (KONTROLNA) SKUPINA | OBOLJELI |
|---------------------|----------------------------------|-------------|
| Dob (godine) | 54,9 ± 14,4 | 52,3 ± 12,1 |
| Spol (ženski/muški) | 16/8 | 16/8 |
| BMI* | 27,7 ± 4,8 | 26,2 ± 4,1 |
| Pušač/nepušač | 8/16 | 8/16 |

*BMI, od engl. *body mass index*

4.2. Koncentracija bakra

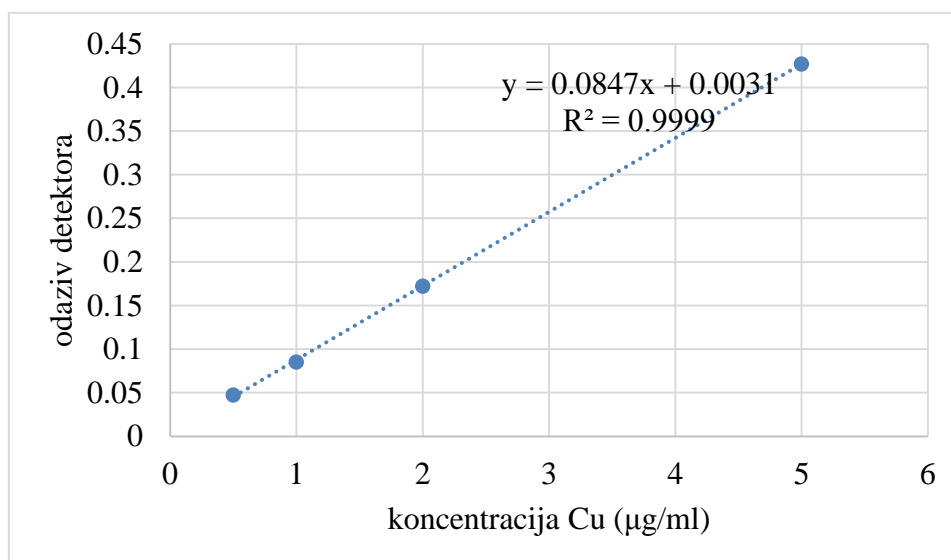
Za određivanje koncentracije bakra u uzorcima plazme korištena je spektrofotometrijska metoda. Kako je najveći dio bakra u plazmi vezan za proteine, bakar se morao osloboditi iz kompleksa s proteinima (zakiseljavanjem i deproteinizacijom) za što je korišten kiseli pH i uz prisustvo gvanidin HCl. Nakon toga uslijedila je reakcija bakra s kelatorom/kromogenom 5-Br-PSAA pri čemu je nastalo crveno obojenje, a čiji je intenzitet izmjeren spektrofotometrijski na 580 nm. Iako je preporučena metoda za određivanje bakra u plazmi AAS (Štraus, 2009), u ovom istraživanju korištena je spektrofotometrijska metoda koju je razvio Makino (1989). Kako bi se ispitala specifičnost metode pripremljeni su standardi bakra koncentracije 0,5; 1,0 i 2,0 $\mu\text{g/mL}$ te im je izmjeren spektar u rasponu valnih duljina 350 do 1000 nm (slika 8.). Izmjereni spektri standardnih otopina bakra u rasponu koncentracija 0,5 - 2,0 $\mu\text{g/mL}$ u reakciji s 5-Br-PSAA pokazali se da je maksimum apsorbancije na 580 nm.



Slika 8. Spektri standardnih otopina bakra u rasponu koncentracija 0,5-2,0 $\mu\text{g/mL}$ u kompleksu s 5-Br-PSAA.

U literaturi se navodi da drugi kationi, poput željeza, kobalta i nikla reagiraju s 5-Br-PSAA. Međutim, kompleks željeza i 5-Br-PSAA nastaje puno sporije kod pH nižega od 5 (Petlevski i sur., 2012). Stoga je pH ove reakcije podešen s acetatnim puferom na 4,2, a također je apsorbancija mjerena odmah nakon dodavanja reagensa (bez inkubacije) kako bi se izbjegle interferencije željeza. Iako se u literaturi preporuča upotreba EDTA kako bi se maskirali kationi koji interferiraju reakciju bakra s 5-Br-PSAA u ovom istraživanju nije korišten EDTA stoga što utječe na stabilnost kompleksa bakra i 5-Br-PSAA (<http://www.sorachim.com/chemicals/chromogens-and-coloring-agents/5-br-psaa.html> / pristupljeno 20. 4. 2017.).

Baždarni pravac dobiven je višestrukim mjerenjem standardnih otopina bakra u rasponu koncentracija bakra od 0,5 do 5,0 $\mu\text{g/ml}$. Baždarni pravac bio je linearan ($R^2=0,999$), a jednadžba pravca bila je $y = 0,0847x + 0,0031$ (slika 9.). Baždarni pravac potvrdio je da je u ispitivano koncentracijsko područje linearno.

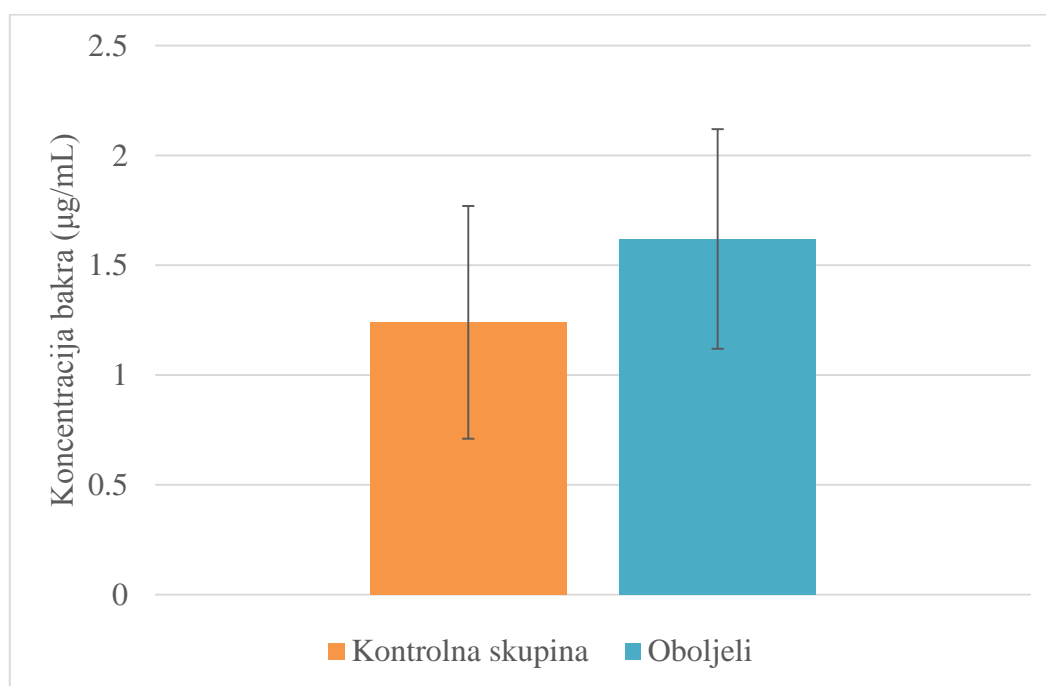


Slika 9. Baždarni pravac standarda bakra u koncentracijskom rasponu 0,5 - 5,0 $\mu\text{g/ml}$.

Ovom metodom je izmjerena koncentracija bakra u kontrolnoj skupini kao i u pacijenata oboljelih od bolesti štitne žlijezde. Dobiveni rezultati prikazani su tablicom 4. i slikom 10. Statistička obrada rezultata pokazala je da je koncentracija bakra viša u pacijenata oboljelih od bolesti štitne žlijezde nego u kontrolnoj (zdravoj) skupini ($P < 0,05$; Mann-Whitney-U test).

Tablica 4. Koncentracija bakra u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih od bolesti štitne žlijezde.

| KONTROLNA SKUPINA | OBOLJELI | STATISTIČKA ZNAČAJNOST |
|-------------------|-----------------|----------------------------------|
| 1,24±0,53 µg/ml | 1,62±0,50 µg/ml | $P < 0.05$ (Mann Whitney U test) |

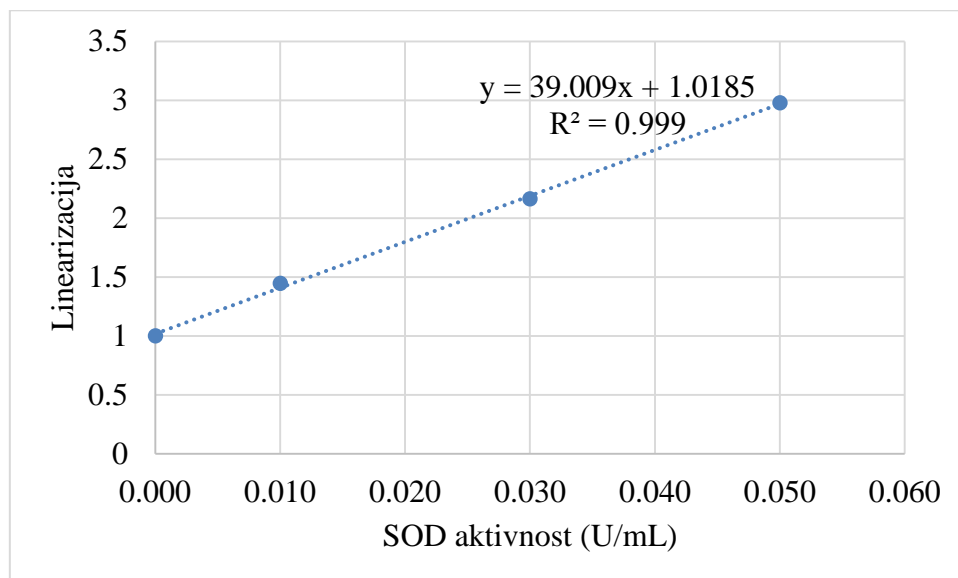


Slika 10. Grafički prikaz koncentracije bakra u serumu kontrolne skupine i oboljelih pacijenata.

4.3. Katalitička aktivnost SOD

Katalitička aktivnost enzima SOD određena je pomoću komercijalnog kita. Tetrazolijeva sol se u prisutnosti superoksidnog radikala pretvara u formazansku boju koja apsorbira na 450 nm. SOD prevodi nastali superoksidni radikal u O_2 i H_2O_2 i što ga više ima, nastaje manje boje. Uzorci plazme kao i standardi SOD aktivnosti u rasponu 0,00 - 0,05 U/ml pripremljeni su prema uputstvu iz kita.

Iz vrijednosti dobivenih za standarde SOD pripremljen je baždarni pravac koji je bio linearan ($R^2 = 0,999$) s jednadžbom pravca $y = 39,009x + 1,0185$. Ti rezultati pokazali su da je metoda u ispitivanom području linearna.

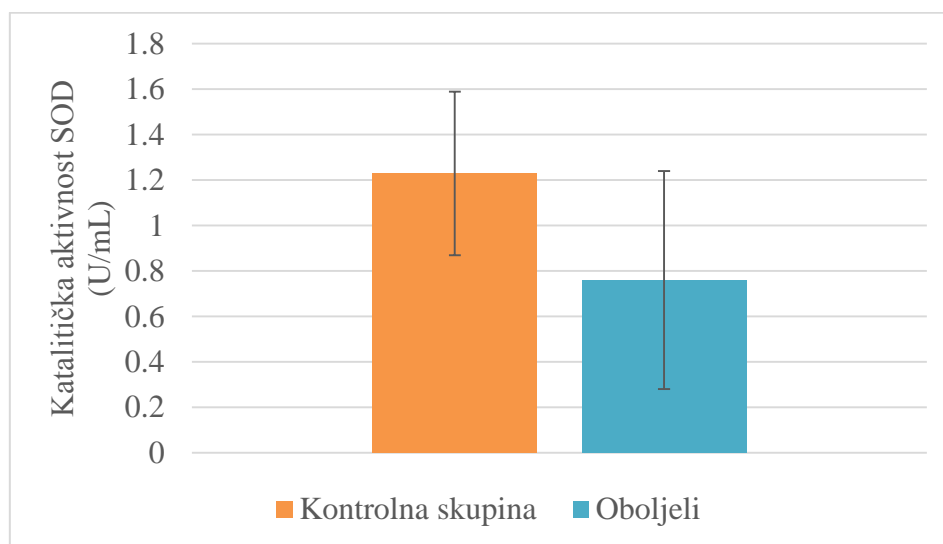


Slika 11. Baždarni pravac za katalitičku aktivnost SOD u rasponu 0,00-0,05 U/mL.

Katalitička aktivnost SOD u uzorcima plazme kontrolne skupine i pacijenata dijagnosticiranih s bolestima štitne žlijezde prikazana je tablicom 5. i slikom 12. Katalitička aktivnost SOD bila je značajno niža ($P < 0,05$; Mann-Whitney-U test) u skupini oboljelih od bolesti štitne žlijezde u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Tablica 5. Katalitička aktivnost SOD u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih od bolesti štitne žlijezde.

| KONTROLNA SKUPINA | OBOLJELI | STATISTIČKA ZNAČAJNOST |
|-------------------|----------------|-------------------------------|
| 1,23±0,36 U/ml | 0,76±0,48 U/ml | P< 0.05 (Mann Whitney U test) |



Slika 12. Grafički prikaz katalitičke aktivnosti SOD u serumu kontrolne skupine i oboljelih pacijenata.

Dobiveni rezultati za koncentraciju bakra i katalitičku aktivnost SOD su međusobno uspoređeni pomoću Spearmanovog testa. Provedena statistička analiza pokazala je da nema korelacije između koncentracija bakra i katalitičke aktivnosti SOD; Spearmanov koeficijent korelacije bio je $R_s = -0,3$.

5. DISKUSIJA

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi ulogu esencijalnog elementa bakra u nastanku bolesti štitne žlijezde. U tu svrhu su se sakupili uzorci plazme oboljelih od štitne žlijezde i kontrolne skupine te se u tim uzorcima odredila razina bakra. U istim uzorcima određena je i katalitička aktivnost antioksidacijskog enzima SOD kako bi se utvrdila razina oksidacijskog stresa. Također, dobiveni rezultati trebali bi nam ukazati da li su razina bakra i katalitička aktivnost SOD kod oboljenja štitne žlijezde povezani.

Uzorci plazme oboljelih od bolesti štitne žlijezde sakupljani su u suradnji s liječnicima iz KBC Sestre milosrdnice. Od sakupljenih 24 uzoraka u 50 % pacijenata je dijagnosticiran papilarni karcinom, 25% pacijenata je dijagnosticiran folikularni adenom, a preostalih 25 % ostala oboljenja štitnjače, struma i Hashimotov tiroiditis. Iako je ispitivana skupina mala (svega 24 pacijenta) ipak se može zaključiti da je u Hrvatskoj najčešće oboljenje štitne žlijezde papilarni karcinom, nakon čega slijedi folikularni adenom te druga oboljenja. Prema Registru za rak, Hrvatskog zavoda za javno zdrastvo, takva je raspodijela i za očekivati, te se može zaključiti da ova skupina predstavlja oboljele od bolesti štitne žlijezde u Hrvatskoj. Pored toga, najviše oboljelih su bile žene (n=16) što potvrđuje da su oboljenja štitne žlijezde češća u žena. Neki istraživači to objašnjavaju različitim imunskim odgovorima između žena i muškaraca (Ferrari i sur., 2017). Dob oboljelih bila je $54,9 \pm 14,4$ godina iz čega proizlazi da od bolesti štitne žlijezde uglavnom oboljevaju ljudi srednje dobi i to uglavnom nepušači (16 nepušača i 8 pušača).

U ovom istraživanju koncentracija bakra određena je spektrofotometrijski, pomoću kromogena 5-Br-PSAA metodom koju je razvio Makino (1989). Preporučena metoda za određivanje bakra u plazmi je AAS (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Ovo istraživanje pokazalo je da spektrofotometrijska metoda također može poslužiti za određivanje razine bakra u plazmi.

Naime, rezultati bakra dobiveni spektrofotometrijskom metodom bili su u referentnom intervalu (0,78 – 1,60 $\mu\text{g/mL}$) što je potvrdilo prihvatljivost spektrofotometrijske metode (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Spektrofotometrijska metoda za određivanje bakra je jednostavna te je stoga pogodna je za one laboratorije koji nemaju dostupan AAS.

Izmjerene vrijednosti bakra u pacijenata dijagnosticiranih s nekom od bolesti štitne žlijezde bile su značajno više od kontrolne skupine. I druga istraživanja zabilježila su povećanu razinu bakra kod tumora. Tako su u svom istraživanju Goyal i suradnici (2006) izmjerili povećanu razinu bakra (ali sniženu cinka i selena) kod pacijenata dijagnosticiranih s karcinomom jednjaka. Istraživanje Goyala i suradnika (2006) u kojem je izmjerena i razina bakra i razina cinka i selena ukazalo je da, iako je bakar esencijalni element kao i cink i selen, ipak ima i neku drugu ulogu u organizmu, ne samo antioksidacijsku kao cink i selen. Istraživači iz Poljske su pak zabilježili povećanu razinu bakra u pacijenata dijagnosticiranih s karcinomom dojke, karcinomom pluća, gastrointestinalnim karcinomom te ginekološkim karcinomima (Zowczak i sur., 2001). Pored toga primjetili su da je razina bakra bila viša u pacijenata dijagnosticiranih s ginekološkim karcinomima (rak ovarija i grlića maternice) nego u onih dijagnosticiranih s gastrointestinalnim karcinomom. Osim navedenih istraživanja i brojna su druga istraživanja pokazala veću koncentraciju bakra u serumu pacijenata oboljelih od tumora nego u zdravih pojedinaca. Također, viša je razina bakra izmjerena i u tumorskom tkivu (Wang, 2010). Istraživanja pokazuju da tumorske stanice nakupljaju bakar, a pored toga pokazano je da veći stupanj bolesti ima višu razinu bakra te da se čak i stupanj bolesti može procijeniti mjerenjem razine bakra. To potvrđuje i zapažanje u ovoj studiji jer je razina bakra bila veća što je bio veći stupanj papilarnog karcinoma. Pretpostavlja se da do nakupljanja bakra u tumorskom tkivu dolazi stoga što je bakar važan angiogeni faktor, odnosno potiče proliferaciju i migraciju epitelnih stanica. Naime, tumorskom tkivu su potrebne krvne žile kako bi se opskrbio s kisikom i hranom, a bakar pomaže u izgradnji krvnih žila.

U ovome istraživanju katalitička aktivnost SOD bila je značajno niža u oboljelih od bolesti štitne žlijezde nego u kontrolnoj skupini. To pokazuje da je u oboljelih došlo do oksidacijskog stresa, odnosno da antioksidacijski enzim SOD pokušava sniziti razinu oksidacijskog stresa koja je prisutna u oboljelih od bolesti štitne žlijezde. Poznato je da je oksidacijski stres mehanizam koji dovodi do nastanka raka (Halliwell i sur., 1992). Pretpostavlja se da je mehanizam nastanka raka povezan s oksidacijskim oštećenjem makromolekula, prvenstveno DNA. Oksidacijska oštećenja DNA, poput oksidacijskih modifikacija nukleinskih baza ili lomova lanaca DNA dovode do oštećenja genetičkog materijala što posljedično dovodi do nastanka raka.

U ovome istraživanju nije nađena korelacija između koncentracije bakra i katalitičke aktivnosti SOD. Iako Milne (1994) navodi da se razina bakra u organizmu može pratiti indirektno mjerenjem koncentracije SOD, rezultati ovoga istraživanja pokazuju da nije tako. U svom preglednom radu Bost i suradnici (2016) navode da razina eritrocitne SOD ne ukazuje na koncentraciju bakra što je u sukladnost s opažanjima u ovome istraživanju.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Povišena razina bakra u oboljelih od bolesti štitne žlijezde u odnosu na kontrolnu skupinu ukazuje na njegovu važnu ulogu u angiogenezi tumorskog tkiva.
- 2) Snižena katalitička aktivnost SOD u oboljelih od bolesti štitne žlijezde u odnosu na zdravu skupinu pokazuje da oksidacijski stres ima važnu ulogu u nastanku (patogenezi) oboljenja štitne žlijezde.
- 3) Iako je u oboljelih od bolesti štitne žlijezde zabilježena značajna promjena u oba parametra, izmjereni parametri, bakar i SOD nisu korelirali što pokazuje da nisu ovisni.
- 4) S obzirom da je kod oboljelih od bolesti štitnjače došlo do značajne promjene u oba parametra (razina bakra je bila značajno viša u oboljelih dok je katalitička aktivnost SOD bila značajno snižena u oboljelih u usporedbi s kontrolnom/zdravom skupinom), oba parametra mogu poslužiti prilikom dijagnoze bolesti štitne žlijezde.

7. LITERATURA

- 1) Berg J.M, Tymoczko J.L i Stryer L. Biokemija. Školska knjiga, Zagreb (2013.)
- 2) Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau J-F, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35 (2016) 107–115.
- 3) Čepelak I, Dodig S. Glutation i oksidacijski stres. *Biochemia Medica*, 13 (2004) 93-100.
- 4) Čvorišćec D. i Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada, Zagreb (2009)
- 5) Ferrari S.M, Fallahi P, Antonelli A i Benvenga S. Environmental Issues in Thyroid Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 8 (2017) 1-8.
- 6) Fraga C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol.*
- 7) Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. i suradnici. *Patofiziologija*. Medicinska naklada, Zagreb (2005)
- 8) Goyal M.M, Kalwar A.K, Vyas R.K, Bhati A. A study of serum zinc, selenium and copper levels in carcinoma of esophagus patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21 (2006.) 208-210.
- 9) Guyton A.C. i Hall J.E. *Medicinska fiziologija – udžbenik*. Medicinska naklada, Zagreb (2012)
- 10) Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*, 119 (1992) 598-620.
- 11) Jalšovec D. *Anatomija: Osnove građe tijela čovjeka za studente*. ZT Zagraf, Zagreb (2013)
- 12) Kujundžić M. i suradnici. *Klinička patofiziologija za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*. FBF, Zagreb (2003)

- 13) Makino T. A sensitive, direct colorimetric assay of serum copper using 5-Br-PSAA. *Clinica Chimica Acta*, 185 (1989) 7-16.
- 14) McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)". *The Journal of Biological Chemistry*, (1969) **244** (22): 6049–55.
- 15) McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radical Biology & Medicine*., (1988) **5** (5-6): 363–9.
- 16) Milne D.B. Assessment of copper nutritional status. *Clin. Chem.* 40 (1994) 1479-1484.
- 17) Petlevski R, Petrik J, Čepelak I, Juretić D. *Opća klinička biokemija (I i II) – Priručnik*. FBF, Zagreb (2012)
- 18) Terres-Martos C, Navarro-Alarcon M, Martin-Lagos F, De la Serrana H.L.G. i Lopez-Martinez M.C. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci. Total Environ*, 198 (1997) 97-103.
- 19) Uriu-Adams JY. i Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (2005) 268–298.
- 20) Wang F, Jiao P, Qi M, Frezza M, Dou Q.P i Yan B. Turning Tumor-Promoting Copper into an Anti-Cancer Weapon via High-Throughput Chemistry. *Curr Med Chem*, 17 (2010) 2685-2698.
- 21) Zowczak M, Iskra M, Torlinski L, Cofta S. Analysis of Serum Copper and Zinc Concentrations in Cancer Patients. *Biological Trace Element Research*, 82 (2001) 1-8.

8. ZAHVALE

Posebnu i iskrenu zahvalu želimo izreći doc. dr. sc. Jasni Jablan na ideji, stručnom vodstvu, utrošenom vremenu i prenesenom znanju.

Velika hvala i izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na velikom strpljenju, podršci i stručnoj pratnji u izradi ovoga rada. Hvala Vam što ste vjerovali u nas.

Iskrena hvala i svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u sklopu kojega je nastao ovaj rad.

Hvala dr.sc. Marku Geriću na ustupljenim uzorcima i pomoći oko statističke obrade rezultata istraživanja.

Iskrena zahvala izv. prof. dr. sc. Roberti Petlevski na omogućenim kemikalijama za spektrofotometrijsko određivanje bakra.

Hvala i djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju što su nam ustupili korištenje čitača pločica.

9. SAŽETAK

Antonio Lukenda i Mario Bažant

Uloga bakra u oboljenjima štitne žlijezde

Štitna žlijezda važan je endokrini organ. Hormoni štitne žlijezde potrebni su za rast i razvoj organizma te kontroliraju metabolizam. U posljednjih desetak godina prema Registru za rak u Hrvatskoj je porastao broj oboljelih od bolesti štitne žlijezde za 60%. Usprkos brojnim istraživanjima, etiologija bolesti štitne žlijezde nije poznata. Bakar je esencijalni element te je sastavni dio brojnih enzima pa tako i antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze (SOD). Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi ulogu bakra u oboljenjima štitne žlijezde. Sakupljeni su uzorci plazme oboljelih od štitne žlijezde ($n = 24$) i zdravih ispitanika koji su predstavljali kontrolnu skupinu. U sakupljenim uzorcima plazme izmjerena je razina bakra te katalitička aktivnost enzima SOD. Grupu oboljelih od bolesti štitne žlijezde činili su: oboljeli od papilarnog karcinoma (50%), folikularnog adenoma (25%) te ostala oboljenja štitnjače (struma i Hashimotov tiroiditis; 25 %). Razina bakra u oboljelih od bolesti štitne žlijezde ($1,62 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$) bila je značajno viša od kontrolne skupine ($1,24 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$; $P < 0,05$; Mann-Whitney U test). Katalitička aktivnost SOD bila je značajno niža u oboljelih od bolesti štitne žlijezde ($0,76 \pm 0,48 \text{ U/ml}$) nego u kontrolnoj skupini ($1,23 \pm 0,36 \text{ U/ml}$; $P < 0,05$, Mann-Whitney U test). Povećana razina bakra u oboljelih od bolesti štitne žlijezde ukazuje na ulogu bakra u angiogenezi tumorskog tkiva. Niža katalitička aktivnost SOD pokazuje da je u oboljelih od bolesti štitne žlijezde povećana razina oksidacijskog stresa, odnosno da je oksidacijski stres važan čimbenik u patogenezi oboljenja štitne žlijezde. Pored toga istraživanje je pokazalo kako su bakar i SOD neovisni parametri čije određivanje može poslužiti u dijagnostici bolesti štitne žlijezde.

Ključne riječi: štitna žlijezda, bakar, superoksid dismutaza, oksidacijski stres, angiogeneza

10. SUMMARY

Antonio Lukenda and Mario Bažant

The role of copper in thyroid gland diseases

Thyroid gland is an important endocrine organ. Thyroid hormones are needed for organism growth and development and also for metabolism control. In last ten years, approximately, according to the Croatian Cancer Register, number of patients with thyroid gland diseases has increased by 60%. Despite the numerous researches, etiology of thyroid gland diseases is unknown. Copper is an essential element and it is the structural part of numerous enzymes including antioxidation enzyme superoxide dismutase (SOD). Objective of this research was to determine the role of copper in thyroid gland diseases. Samples of plasma were obtained from patients with thyroid gland diseases ($n = 24$) and healthy participants which formed control group. In the collected plasma samples, both copper level and catalytic activity of SOD enzyme were measured. Group of patients with thyroid gland diseases was consisted of patients with papillary carcinoma, follicular adonoma, goitre and Hashimoto's thyroiditis. Copper levels in thyroid gland diseased ($1,62 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$) were significantly higher than control group ($1,24 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$; $P < 0,05$, Mann-Whitney U test). Catalytic activity of SOD was significantly lower in thyroid gland diseased ($0,76 \pm 0,48 \text{ U/ml}$) than control group ($1,23 \pm 0,36 \text{ U/ml}$; $P < 0,05$, Mann-Whitney U test). Increased levels of copper in thyroid gland diseased point to the role of copper in angiogenesis of neoplasm tissue, whilst lower catalytic activity of SOD points to higher levels of oxidation stress in thyroid gland diseased, ie. that oxidation stress is an important factor in pathogenesis of thyroid gland diseases. Nevertheless, research has shown that copper and SOD are independent parameters whose quantification can be useful in diagnosis of thyroid gland diseases.

Key words: thyroid gland, copper, superoxide dismutase (SOD), oxidation stress, angiogenesis

11. ŽIVOTOPISI

Antonio Lukenda

Rođen sam 2. svibnja 1995. godine u Zagrebu. Maturirao sam u Nadbiskupskoj klasičnoj gimnaziji s pravom javnosti u Zagrebu kao maturant generacije. Godine 2014. bio sam prvak Grada Zagreba u poznavanju grčkoga jezika te sam prisustvovao Državnom natjecanju iz latinskog i grčkog jezika iste godine. Student sam 3. godine studija medicinske biokemije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. U slobodno vrijeme pjevam u pjevačkom zboru FBF-a te držim različite instrukcije. Sudjelovao sam u izvođenju praktičnog dijela nastave kao demonstrator u sklopu kolegija Stanična biologija s osnovama genetike.

Mario Bažant

Rođen sam 6.7.1995. Dolazim iz Grubišnog Polja nedaleko Daruvara gdje sam i maturirao u srednjoj školi Bartola Kašića 2014. godine. Student sam 3. godine medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Od značajnijih postignuća valja spomenuti sudjelovanje na Državnom natjecanju iz informatike u kategoriji osnove informatike 2014. godine, a zanimanje za informatiku i dan-danas je poprilično jako. Slobodno vrijeme volim provesti zabavljajući se s društvom, slušajući kvalitetnu glazbu ili, ako vrijeme dopusti, vožnjom bicikla ili trčanjem.